

**Differenzierung adulter Stammzellen
nach Transplantation in die Leber
immundefizienter Mäuse**

Vom Fachbereich Chemie der
Technischen Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
genehmigte Dissertation
(D386)

Vorgelegt von
Diplom Lebensmittelchemiker
Marc Brulport

Kaiserslautern 2006

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum vom Januar 2002 bis Juni 2003 am Institut für Toxikologie der Universität Mainz, und vom Juni 2003 bis März 2006 am Zentrum für Toxikologie der Universität Leipzig unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Hengstler, Universität Leipzig, und externer Betreuung durch Herrn Prof. Dr. Eisenbrand, Technische Universität Kaiserslautern, durchgeführt.

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 07. September 2006

Promotionskommission:

- Vorsitzender: Prof. Dr. Trommer, Technische Universität Kaiserslautern
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Eisenbrand, Technische Universität Kaiserslautern
 2. Berichterstatter: Prof. Dr. Hengstler, Universität Leipzig

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Stammzelltechnologie als Perspektive	5
1.2	Primäre Hepatozyten in Forschung und Klinik	5
1.3	Definition einer Hepatozyte anhand metabolischer Eigenschaften	6
1.4	<i>In vivo</i> Experimente zur Besiedlung der Leber in Repopulationsassays	8
1.5	Fusion oder Differenzierung muriner Stammzellen <i>in vivo</i>	11
1.5.1	Mögliche Anwendungen fusionierter und differenzierter Stammzellen	11
1.5.2	Strategien zur Aufklärung von Fusion und Differenzierung	12
1.6	Transplantation humaner Stamm- und Vorläuferzellen ins Tiermodell	15
1.7	Fusion oder Differenzierung humaner Stammzellen <i>in vivo</i>	16
1.8	Charakterisierung differenzierter humaner Stammzellen <i>in vivo</i>	16
1.9	<i>In vitro</i> Differenzierung humaner extrahepatischer Stammzellen	17
1.10	<i>In vitro</i> Differenzierung peripherer Blutmonozyten	19
2	Material	21
2.1	Zellkultur	21
2.1.1	Zellkulturmedien	21
2.1.2	PBS-Waschpuffer (nach Dulbecco) einfach konzentriert	22
2.1.3	Trypanblau	23
2.1.4	Kollagen	23
2.1.5	Weitere Chemikalien und gebrauchsfertige Lösungen für die Zellkultur	23
2.1.6	Materialien und Geräte in der Zellkultur	23
2.2	Transplantation, Explantation und Einbetten	24
2.2.1	Versuchstiere	24
2.2.2	Narkose und Lösungen	24
2.2.3	Materialien und Geräte	24
2.3	Immunhistochemie und <i>in situ</i> Hybridisierung	25
2.3.1	Wasch- und Aufschlusspuffer, wässrige Eindeckmittel	25
2.3.2	Antikörper in der Immunhistochemie	26
2.3.3	Sonden und Antikörper in der <i>in situ</i> Hybridisierung	26
2.3.4	Weitere Chemikalien	26
2.3.5	Materialien und Geräte	27
2.4	Histologische Standardfärbungen	27
2.4.1	Berliner-Blau-Reaktion	27
2.4.2	PAS-Färbung	27

2.5	Mikroskop	28
2.5.1	Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie	28
2.5.2	Konfokale Mikroskopie.....	28
2.6	PCR-Untersuchungen.....	28
2.6.1	Pufferlösungen	28
2.6.2	Primer	29
2.6.3	Weitere Chemikalien.....	29
2.6.4	Geräte	29
2.7	Induktionsversuche.....	30
2.7.1	Chemikalien	30
2.7.2	Materialien und Geräte.....	30
3	Methoden.....	31
3.1	Gewinnung und Aufbereitung der Stamm- und Vorläuferzellen	31
3.1.1	Adhärent proliferierende Nabelschnurblutzellen	31
3.1.2	Aus peripheren Blutmonozyten <i>in vitro</i> vordifferenzierte Neohepatozyten	32
3.1.3	Nestin-positive hepatopankreatische Vorläuferzellen.....	33
3.1.4	Humane Primärhepatozyten	34
3.2	Zellkultur.....	34
3.2.1	Adhärent proliferierende Nabelschnurblutzellen und hepatopankreatische Zellen	34
3.2.2	Aus peripheren Blutmonozyten <i>in vitro</i> vordifferenzierte Hepatozyten-ähnliche Zellen	35
3.3	Transplantation der Stamm- und Vorläuferzellen.....	35
3.3.1	Versuchstiere.....	35
3.3.2	Vorbereitung der Zellen zur Transplantation	35
3.3.3	Transplantation der Zellen ins Leberparenchym.....	38
3.3.4	Transplantation der Zellen in die Leber via Milz.....	39
3.4	Explantation der transplantierten Lebern	39
3.5	Fixierung humaner Lebern	41
3.6	Immunhistochemie zur Detektion humanen Albumins.....	41
3.6.1	Entparaffinisierung und Demaskierung der Antigene.....	42
3.6.2	Blocken unspezifischer Reaktionen und Bindungsstellen	42
3.6.3	Inkubation mit Erstantikörper spezifisch gegen humanes Albumin	43
3.6.4	ABC-Methode	43
3.6.5	Indirekte Fluoreszenz-Methode.....	44

3.6.6	Entwässern der Schnitte und Eindecken	45
3.7	Immunhistochemie zur Detektion murinen Albumins	45
3.8	Immunhistochemie mit Antikörpern gegen huAlb und muAlb	45
3.9	<i>In situ</i> Hybridisierung	46
3.9.1	Denaturierung und Hybridisierung	46
3.9.2	Stringentes Waschen	47
3.9.3	Blocken unspezifischer Bindungsstellen	47
3.9.4	Detektion der Sonden	47
3.9.5	Eindecken der Proben	47
3.10	<i>In situ</i> Hybridisierung und Immunhistochemie kombiniert	48
3.11	Immunhistochemie zur Detektion humaner Hepatozyten	48
3.12	Histologische Standardfärbungen	49
3.12.1	Eisennachweis mittels Berliner-Blau-Reaktion	49
3.12.2	PAS-Reaktion zum Nachweis von Glykogen	50
3.13	Mikroskopische Auswertung	50
3.14	PCR-Untersuchungen	50
3.14.1	Isolierung der DNA aus dem Lebergewebe	50
3.14.2	Gelelektrophorese	52
3.14.3	Intron-PCR zur spezifischen Amplifikation humanen Albumins	52
3.14.4	Duplex-PCR zur quantitativen Bestimmung humaner DNA im murinen Gewebe	54
3.15	<i>In vitro</i> Charakterisierung der Neohepatozyten	55
3.15.1	Induktion der Neohepatozyten	55
3.15.2	Durchführung der Messung	56
4	Ergebnisse	57
4.1	Identifikation der transplantierten Zellen nach Markierung	57
4.1.1	CM-DiI	57
4.1.2	Qdot655 Nanopartikel	58
4.2	Analyse humaner Hepatozytenfaktoren (Albumin und HepPar)	60
4.2.1	Immunhistochemische Detektion humanen Albumins	60
4.2.2	Kombinierte Immunhistochemie zur simultanen Detektion humanen und murinen Albumins	68
4.2.3	Immunhistochemische Detektion des HepPar-Antigens	69
4.3	Histologische Standardfärbungen	71
4.3.1	Glykogennachweis durch die PAS-Reaktion	72

4.3.2	Eisennachweis durch Berliner-Blau-Reaktion	72
4.4	Untersuchung auf Zellen humanen Ursprungs.....	73
4.4.1	Speziesspezifität und Sensitivität	73
4.4.2	Transplantation humaner Primärhepatozyten als Positivkontrolle.....	74
4.4.3	<i>In situ</i> Hybridisierung nach Transplantation adhärent proliferierender Nabelschnurblutzellen	75
4.5	Quantifizierung menschlicher DNA in der Mausleber (nach der Transplantation von Nabelschnurblutzellen).....	79
4.6	Intron-PCR zum Nachweis humaner DNA	81
4.6.1	Serielle Verdünnungsreihe zum Abschätzen der Sensitivität	81
4.6.2	Intron-PCR mit genomischer DNA isoliert aus mit adhärent proliferierenden Nabelschnurblutzellen transplantierten Mauslebern	82
4.6.3	Intron-PCR mit genomischer DNA isoliert aus Mauslebern, die mit weiteren Zelltypen transplantiert wurden	82
4.7	<i>In vitro</i> Untersuchungen.....	83
4.7.1	Phase I-Metabolismus der Neohepatozyten	83
5	Diskussion.....	85
5.1	Aktuelle Arbeiten zum Schicksal transplantiertter Stammzellen in der Leber von Versuchstieren.....	85
5.2	Identifikation der transplantierten Zellen.....	87
5.3	Beobachtung von zwei Typen human Albumin-positiver Zellen	89
5.4	Typ I-Zellen.....	90
5.5	Typ II-Zellen	91
5.6	Charakterisierung der eingesetzten Nabelschnurblutzellen	93
5.7	Hepatopankreatische Vorläuferzellen und Neohepatozyten	99
5.8	<i>In vitro</i> Charakterisierung der Neohepatozyten	100
6	Zusammenfassung.....	102
7	Literaturverzeichnis	104
8	Anhang.....	112

1 Einleitung

1.1 Stammzelltechnologie als Perspektive

Schon zu den Zeiten griechischer Sagen ahnte man von der Regenerationsfähigkeit der menschlichen Leber. So wurde Prometheus von Zeus zur Strafe, dass er auf Erden die Menschen erweckt und mit Leben gefüllt hat, in die schlimmste Einöde des Kaukasus verschleppt. Ohne Nahrung musste er dort Tag und Nacht ausharren, und über sich ergehen lassen, dass jeden Tag der Adler Ethon ein Stück seiner Leber fraß. Da Prometheus ein Unsterblicher war, regenerierte sich seine Leber und wurde tags drauf wieder von Ethon gefressen. Erlösung fand Prometheus durch Herakles, der den Adler erschlug. Heute ist bekannt, dass man kein Unsterblicher sein muss, damit eine Regeneration der Leber stattfindet. Anders als andere Organe ist die Leber in der Lage innerhalb kurzer Zeit nach Verletzungen zu regenerieren. Bereits wenige Wochen nach einer Hepatektomie ist die normale Lebermasse wieder hergestellt (Kobayashi *et al.* 2006; Francavilla *et al.* 1990). Trotz ihrer bemerkenswerten Fähigkeit zur Selbsterneuerung besteht für klinische Anwendungen ein Bedarf an Spenderorganen, der nicht durch Organspenden gedeckt werden kann. Zwar ist in den vergangenen Jahren die Bereitschaft zur Organspende gestiegen, so dass im Jahre 2005 bereits 844 Leberorgane gespendet wurden. Dem gegenüber steht ein Bedarf an 1100 Spenderlebern (Quelle: Deutsche Stiftung Organtransplantation, DSO). Zusätzlich sind humane Hepatozyten für die pharmakologische und toxikologische Forschung von Bedeutung. Mit der Generierung von Hepatozyten oder Zellen mit Hepatozyten-ähnlichen Eigenschaften aus Stamm- und Vorläuferzellen steht langfristig eine mögliche Alternative zur Deckung eines weiter steigenden Bedarfs an Spenderorganen und humanen Hepatozyten zur Verfügung.

1.2 Primäre Hepatozyten in Forschung und Klinik

Humane primäre Hepatozyten sind in der pharmakologischen und toxikologischen Forschung ein gut etabliertes und oft verwendetes Werkzeug zur Bestimmung des Metabolitenspektrums von Fremdstoffen (Hengstler *et al.* 2000a; Hengstler *et al.* 2000b; Hengstler *et al.* 2003; Li *et al.* 1999; Ringel *et al.* 2002; Ringel *et al.* 2005; Reder-Hilz *et al.* 2004; Carmo *et al.* 2004; Carmo *et al.* 2005; Karim *et al.* 2002). Da sich die Expression fremdstoffmetabolisierender Enzyme zwischen den Spezies unterscheiden kann (Shimada *et al.* 1997), eignen sich Hepatozyten anderer Spezies nicht immer, um das Metabolitenspektrum und damit eine mögliche Toxizität am Menschen vorherzusagen. Zum Beispiel ist der häufig eingesetzte Protonenpumpeninhibitor Pantoprazol nicht hepatotoxisch beim Menschen, da der toxische Metabolit

Benzidiazothioharnstoff durch humane Hepatozyten nicht gebildet wird. In gleicher Dosis ist Pantoprazol für Hunde letal (Gebhardt *et al.* 2003).

Neben solchen *in vitro* Untersuchungen können humane Primärhepatozyten auch in zellbasierten Therapien akuter und chronischer Lebererkrankungen verwendet werden. Durch eine Transplantation humaner Hepatozyten kann beispielsweise die Zeit bis zur Organtransplantation überbrückt werden (Strom *et al.* 1997b; Bilir *et al.* 2000), die Sterblichkeit bei akutem Leberversagen reduziert werden (Fisher *et al.* 2000; Ott *et al.* 2000), oder bei metabolischen Lebererkrankungen eine Therapie durchgeführt werden (Strom *et al.* 1997a; Fox *et al.* 1998; Sokal *et al.* 2003; Muraca *et al.* 2002; Horslen *et al.* 2003; Mitry *et al.* 2004; Dhawan *et al.* 2004; Ambrosino *et al.* 2005; Stephenne *et al.* 2005; Hughes *et al.* 2005). Eine zellbasierte Therapie hat gegenüber einer Organtransplantation den Vorteil, dass sie weit weniger invasiv ist, und mehrfach hintereinander durchgeführt werden kann (Nussler *et al.* 2006).

Humane Primärhepatozyten sind sowohl frisch isoliert als auch kryokonserviert kommerziell erhältlich, allerdings übersteigt wie bei kompletten Spenderorganen die Nachfrage das Angebot. Limitierend ist hierbei vor allem, dass es bislang nicht möglich ist, humane Primärhepatozyten *in vitro* zu expandieren. Dem steht eine deutliche Regenerationsfähigkeit humaner Lebern *in vivo*, beispielsweise nach partieller Hepatektomie gegenüber. Kritische Faktoren für die *in vivo* Proliferation von humanen Hepatozyten sind HGF (*engl. hepatocyte growth factor*), EGF (*engl. epidermal growth factor*), FGF (*engl. fibroblast growth factor*), VEGF (*engl. vascular endothelial growth factor*), IL-6 (Interleukin-6), TGF α (*engl. transforming growth factor α*), Schilddrüsenhormone, Insulin und Noradrenalin (Hengstler *et al.* 2005; Michalopoulos & DeFrances 1997), die aber nicht für eine *in vitro* Proliferation ausreichend sind.

1.3 Definition einer Hepatozyte anhand metabolischer Eigenschaften

Seit 1999 wurde in vielen Publikationen berichtet, dass die Generierung von Hepatozyten aus verschiedenen extrahepatischen Stamm- und Vorläuferzellen möglich sei. Da sich die aus den verschiedenen Quellen gewonnenen Stamm- und Vorläuferzellen in der Regel *in vitro* gut expandieren und bei Bedarf neu generieren lassen, wären daraus generierte Hepatozyten praktisch unbegrenzt verfügbar. Für die aus Stamm- und Vorläuferzellen generierten Hepatozyten-ähnlichen Zellen wurden zudem morphologische (Ruhnke *et al.* 2005a; Zhao *et al.* 2003) und metabolische Charakteristika wie eine induzierbare Cytochrom P450-Aktivität (Schwartz *et al.* 2002; Ruhnke *et al.* 2005c) berichtet, die die generierten Hepatozyten zu einem Ersatz für humane Primärhepatozyten machen könnten. Außerdem wurde die Expression

weiterer Hepatozyten-Marker wie Albumin oder Cytokeratin 18 (CK18) in den aus Stammzellen *in vitro* generierten Zellen nachgewiesen. Hingegen wiesen die Ausgangszellen weder eine Hepatozyten-ähnliche Morphologie, noch eine induzierbare Cytochrom P450-Aktivität auf. Auch Marker wie Albumin oder Cytokeratin 18 (CK18) waren in den Vorläuferzellen nicht exprimiert (Ruhnke *et al.* 2005c;Zhao *et al.* 2003). Aufgrund dieser Ergebnisse werden die *in vitro* generierten Zellen oftmals als Hepatozyten, funktionelle Hepatozyte oder Leberzelle bezeichnet.

Bei genauerer Betrachtung treten aber Unterschiede zu primären humanen Hepatozyten hervor. Zwar sind Hepatozyten unter normalen physiologischen Bedingungen die einzigen Zellen, die Albumin bilden, es ist jedoch bekannt, dass auch Hepatomzellen und pankreatische Tumorzellen zur Albuminproduktion in der Lage sind (Hengstler *et al.* 2005;Eberhardt *et al.* 2006), denen jedoch die metabolische Kapazität humaner Primärhepatozyten fehlt. Ebenso zeigen viele *in vitro* generierte Hepatozyten-ähnliche Zelltypen ein von humanen Primärhepatozyten verschiedenes Spektrum an Cytochrom P450-Isoenzymen, auch werden nicht alle Marker exprimiert. Da die biochemischen und metabolischen Eigenschaften primärer Hepatozyten gut charakterisiert sind (Hengstler *et al.* 2000b;Gebhardt *et al.* 2003;Steinberg *et al.* 1999), lassen sich daraus Bedingungen ableiten, die eine *in vitro* generierte Hepatozyten-ähnliche Zelle für unterschiedliche Fragestellungen erfüllen muss.

Tabelle 1: Kriterien für Hepatozyten und Hepatozyten-ähnliche Zellen (Hengstler *et al.* 2005)

Biochemische Eigenschaften						
Albumin-Synthese			Harnstoff-Synthese		Fibrinogen-Synthese	
Enzyme des Phase I-Metabolismus						
CYP1A1/2	CYP2A6	CYP2B6	CAP2C8/9/19	CYP2D6	CYP2E1	CYP3A4/5
Substrate für den Phase I-Metabolismus						
Cumarin (CYP2A6)		Koffein (CYP1A2)		Diclofenac (CYP2C9)		
Bupropion (CYP2B6)		S-Mephenytoin (CYP2C19)		Dextrometorphan (CYP2D6)		
Verapamil (CYP3A4 und CYP2C8)						
Enzyme des Phase II-Metabolismus						
UDP-Glucuronosyltransferasen (UDPGT)			Glutathion-S-transferasen (GST)		Sulfotransferasen (ST)	
Substrate für den Phase II-Metabolismus						
4-Methylumbelliferon (UDGPT)		1-Chloro-2,4-dinitrobenzol (GST)		2-Naphthol und p-Nitrophenol (ST)		
Dextrometorphan (UDGPT, ST)						
Enzym-Induktoren						
Rifampicin (CYP3A4)	3-Methylcholanthren (CYP1A1 und CYP1A2)			Phenobarbital (CYP2B)		

Für toxikologische Untersuchungen muss eine Hepatozyte in der Lage sein, a) Metabolismus von Fremdstoffen und endogenen Substanzen (Hormone, Harnstoffzyklus), b) Synthese von Albumin, Koagulationsfaktoren, Transporterproteinen, Galle, Fetten und Lipoproteinen, sowie c) Speicherung von Glucose als Glykogen, fettlöslicher Vitamine (Vitamin A, D, E, K), Folat, Vitamin B₁₂, Kupfer und Eisen zu betreiben (Hengstler *et al.* 2005) (Tabelle 1). Da in Assays immer nur eine begrenzte Anzahl aller möglichen Parameter bestimmt werden kann, ist eine *in vitro* generierte Zelle, auch wenn sie alle in Tabelle 1 genannten Bedingungen erfüllt, nicht zwingend gleichwertig mit primären Hepatozyten. Für Fremdstoffmetabolismus-Untersuchungen ist eine *in vitro* generierte Zelle aber praktisch gleichwertig mit humanen Primärhepatozyten, wenn die Aktivitäten der in Tabelle 1 genannten Enzyme sowohl basal als auch induziert eine primären Hepatozyten vergleichbare Aktivität aufweisen. Einige der genannten Marker weisen aufgrund genetischer Polymorphismen interindividuelle Unterschiede auf (Hengstler *et al.* 1999). Bei diesen ist jedoch die Verteilung innerhalb der Bevölkerung bekannt, so dass sich auch die Aktivität der Enzyme bei aus Stammzellen generierten Zellen in ähnlichem Rahmen bewegen sollte. Vergleicht man hinsichtlich der genannten Marker die Literatur, scheinen manche der Eigenschaften leichter als andere erfüllt werden zu können. In aus Stammzellen abgeleiteten Hepatozyten-ähnlichen Zellen werden Albuminbildung und Harnstoffzyklus oft beobachtet, aber eine humanen Hepatozyten vergleichbare CYP3A4-Aktivität wurde bislang noch nie bei *in vitro* aus Stamm- und Vorläuferzellen generierten Hepatozyten-ähnlichen Zellen nachgewiesen.

1.4 *In vivo* Experimente zur Besiedlung der Leber in Repopulationsassays

Neben der hier gezeigten *in vitro* Differenzierung unterschiedlicher Stammzelltypen besteht die Möglichkeit *in vivo* nach Transplantation von Stamm- und Vorläuferzellen eine hepatozelluläre Differenzierung mithilfe von Repopulationsassays zu zeigen. In einem solchen Assay werden je nach Versuchsaufbau verschieden aufgereinigte Stammzellpopulationen in ein geeignetes Tiermodell transplantiert. Hierzu eignen sich solche Modelle, bei denen entweder aufgrund genetischer Defekte des Wirtstieres oder durch eine chemische Behandlung mit lebertoxischen Substanzen den transplantierten Stammzellen ein besonderer Differenzierungsanreiz gegeben wird. Findet eine Besiedlung der Wirtsleber mit transplantierten Stammzellen statt, heißt dies im Umkehrschluss aber nicht, dass der gleiche Zelltyp auch *in vitro* zu einer Hepatozyten-ähnlichen Zelle differenziert.

Bereits 1999 wurde von Petersen *et al.* über eine hepatozelluläre Differenzierung von Knochenmarksstammzellen berichtet (Petersen *et al.* 1999). Im beschriebenen Versuch wurden zunächst weibliche F-344 Ratten mit einer Dosis von 9,5 Gy letal bestrahlt (Murase *et al.*

1996), um das Knochenmark der Empfängertiere zu zerstören. Anschließend wurden den weiblichen Ratten Knochenmarksstammzellen männlicher F-344 Ratten transplantiert. Um eine Leberregeneration auszulösen, wurden die transplantierten weiblichen Ratten mit Tetrachlorkohlenstoff (CCl_4) und 2-Acetylaminofluoren (2-AAF) behandelt. CCl_4 wird metabolisch durch CYP2E1 aktiviert. Da CYP2E1 vor allem um die Zentralvene exprimiert wird, werden primär die perizentral gelegenen Hepatozyten geschädigt. Um auch die periportal gelegenen Hepatozyten zu schädigen, wird 2-AAF verwendet. 2-AAF wird in der Phase II-Reaktion durch periportal exprimierte Sulfotransferasen metabolisch aktiviert. Durch die Kombination beider Stoffe wird eine umfassende Schädigung aller Hepatozyten eines Leberläppchens erreicht, eine Regeneration kann nicht mehr durch Zellteilungen intakter Hepatozyten erfolgen, so dass ein Differenzierungsanreiz für die transplantierten Stammzellen geschaffen wird. Unter diesen experimentellen Bedingungen wurden Y-Chromosom-positive Hepatozyten in der Leber der weiblichen Ratten gefunden. In einem weiteren Experiment wurden Knochenmarksstammzellen aus männlichen Dipeptidylpeptidase IV⁺ (DPPIV⁺) F-344 Ratten in mit 9,5 Gy bestrahlte DPPIV defiziente (DPPIV⁻) weibliche F-344 Ratten transplantiert, was zur Expression von DPPIV in den Gallengangskanälchen zwischen den Hepatozyten der weiblichen DPPIV⁻ - F344-Ratte führte.

Von Theise et al. wurde gezeigt, dass auch in einem Tiermodell ohne Schädigung der Leber mit CCl_4 und 2-AAF Knochenmarksstammzellen nach Transplantation in der Leber des Empfängertiers gefunden werden können (Theise *et al.* 2000). Hierzu wurden weibliche B6D2F1 Mäuse letal bestrahlt und im Anschluss mit aus dem Knochenmark männlicher B6D2F1 Mäuse gewonnenen Stammzellen transplantiert. Auch hier wurden in der Leber des Weibchens Hepatozyten mit Y-Chromosom gefunden.

In der Gruppe von Lagasse et al. wurden ähnliche Experimente mit hämatopoetischen Stammzellen durchgeführt. Hierbei wurden die Transplantationen in Fumarylacetoacethydrolase-defizienten (FAH^{-/-}) Mäusen durchgeführt (Lagasse *et al.* 2000). Beim Phenylalanin-Abbau über Tyrosin wird durch die Fumarylacetoacethydrolase 4-Fumarylacetoacetat zu Fumarat und Acetoacetat abgebaut (Abbildung 1) (Streeter 1995). Bei Tyrosinämie Typ I, einer Stoffwechselkrankheit, bei der dieses Enzym defekt ist, kommt es zu einer Anreicherung der lebertoxischen Metabolite 4-Maleylacetat und dem aus Isomerisierung daraus entstehende 4-Fumarylacetoacetat. Hierdurch kommt es zu einem massiven Untergang von Hepatozyten (Stangl *et al.* 2000). Somit eignen sich FAH-defiziente Mäuse (FAH^{-/-}) besonders für Repopulationsassays. Durch diesen Enzymdefekt erlangen die transplantierten Zellen gegen-

über den Maushepatozyten, in denen es durch Anhäufung der toxischen Metabolite zu einer fortschreitenden Zerstörung der Leber kommt, einen Selektionsvorteil.

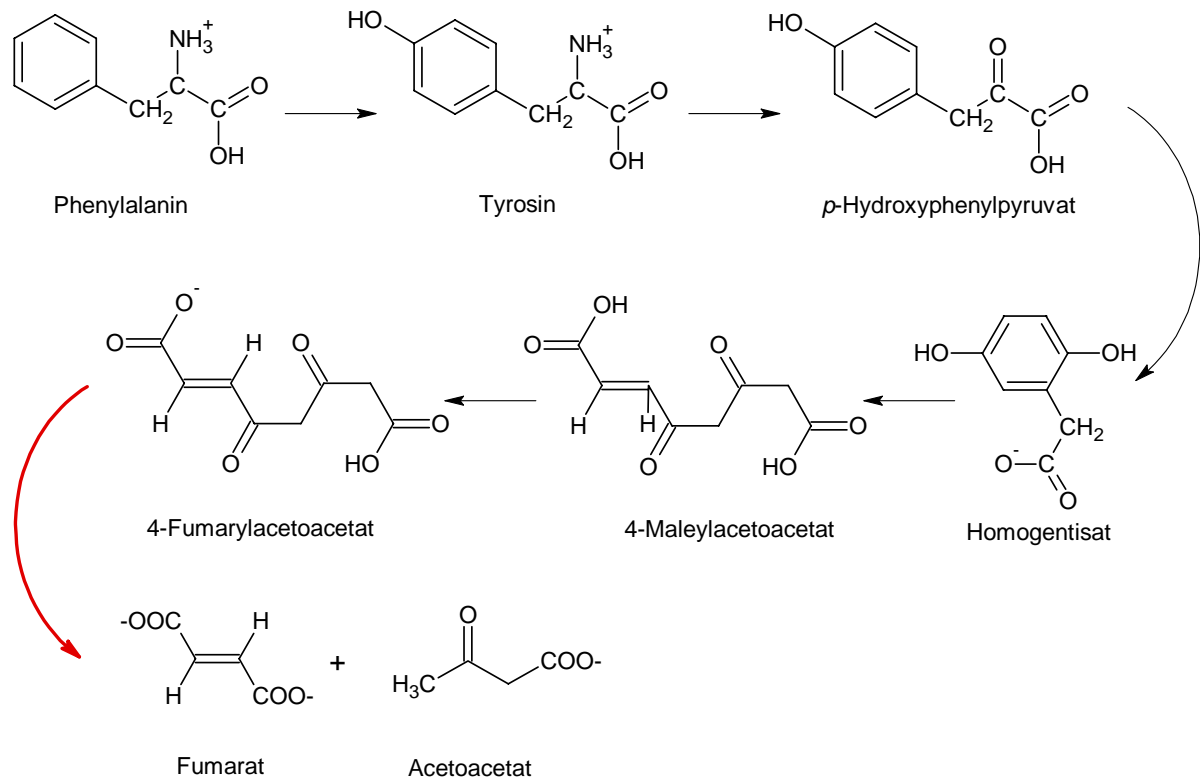


Abbildung 1: Phenylalanin / Tyrosinabbau (Streier 1995). Der rote Pfeil markiert den katalytischen Schritt der Fumarylacetoacetylhydrolase. Fehlt dieses Enzym akkumulieren die lebertoxischen Metabolite 4-Maleylacetat und 4-Fumarylacetat.

FAH^{-/-}-Mäuse können ohne Transplantation nur überleben, wenn sie kontinuierlich mit 2-(2-Nitro-4-trifluoromethylbenzol)-1,3-cyclohexanendion (NTBC) behandelt werden, wodurch die Bildung von 4-Maleylacetoacetat und 4-Fumarylacetoacetat verhindert wird. Im Experiment von Lagasse et al. wurden angereicherte c-kit⁺ hämatopoetische Stammzellen aus dem Knochenmark männlicher ROSA26/BA-Mäuse intravenös in letal bestrahlte weibliche FAH^{-/-}-Mäuse injiziert. Über einen Zeitraum von 2 Monaten wurde NTBC über das Trinkwasser verabreicht. Um den Leberschaden zu induzieren, wurde nach dieser Zeit das NTBC sukzessive entzogen. Nach vier Monaten erfolgte eine Untersuchung der Lebern, wobei β-Galaktosidase-positive Knötchen mit Durchmessern von 0,5 bis 4mm gefunden wurden, die Y-Chromosome enthielten, sowie FAH und Albumin exprimierten (Lagasse *et al.* 2000).

Durch solche Repopulationsassays kann eindrucksvoll eine Besiedlung der Wirtsleber mit transplantierten Stammzellen nachgewiesen werden. Teilweise ist dabei sogar eine funktionelle Verbesserung der Leberfunktionen zu beobachten, was vor allem im Hinblick auf eine klinische Anwendung interessant erscheint. Allerdings lässt sich anhand solcher Besied-

lungsversuche nicht beantworten, ob eine Fusion der transplantierten Zellen mit Mauszellen oder eine Transdifferenzierung der transplantierten Stammzellen stattgefunden hat.

1.5 Fusion oder Differenzierung muriner Stammzellen *in vivo*

1.5.1 Mögliche Anwendungen fusionierter und differenzierter Stammzellen

Es ist bekannt, dass Stammzellen mit Wirtszellen fusionieren können. Hierbei kommt es zu einer zytoplasmatischen Durchmischung. Dies kann zu einer Umprogrammierung des ursprünglichen Zelltyps führen (Cowan *et al.* 2005). Dem gegenüber stehen *in vitro* Experimente, bei denen durch Kultur in speziellen Medien eine zumindest teilweise Differenzierung erreicht wird. Durch die Mikroumgebung der Leber werden den Stammzellen nach Transplantation eine Vielzahl an Wachstumsfaktoren und -stimuli bereitgestellt, die zu einer Differenzierung der Stammzellen führen können. Aufgrund des unterschiedlichen möglichen Schicksals der transplantierten Zellen ergeben sich theoretisch verschiedene klinische Anwendungen.

Fusionierende Zellen könnten als Transporter für eine Gentherapie bei monogenetischen Lebererkrankungen verwendet werden. Ein Beispiel hierfür ist der durch einen Defekt in der Kupfer-transportierenden ATPase (ATP7B) verursachte Morbus Wilson. Hierbei wird Kupfer in der Leber akkumuliert, wodurch die Hepatozyten geschädigt werden und zu Grunde gehen (Howell & Mercer 1994). Stammzellen könnten hierbei durch Fusion das fehlende Wildtyp-Gen ATP7B einführen. Käme es dann zu einer Expression dieses Gens in den fusionierten Hepatozyten, hätte der Phänotyp fusionierter Zellen gegenüber den ATP7B-defizienten Hepatozyten einen Selektionsvorteil. Gleiches gilt für den oben angesprochenen FAH-Stoffwechseldefekt, bei dem toxische Metabolite in der defizienten Hepatozyte akkumulieren. Im Gegensatz zu diesen beiden Beispielen stehen monogenetische Erkrankungen, die für die Hepatozyten keinen Selektionsvorteil bedeuten. Ein Beispiel hierfür ist Hämophilie A durch fehlenden Faktor VIII. Auch hier könnte eine Fusion der Faktor VIII-defizienten Hepatozyte mit einer Stammzelle, die das intakte Gen trägt, zur Expression von Faktor VIII in der fusionierten Zelle führen. Da durch ein Fehlen von Faktor VIII keine toxischen Metabolite oder Metalle in der Hepatozyte akkumulieren, geht die Faktor VIII-Defizienz mit keinem Untergang der betroffenen Hepatozyten einher. Hepatozyten, die durch Fusion wieder in der Lage sind, Faktor VIII zu exprimieren, hätten gegenüber den defizienten Hepatozyten keinen Selektionsvorteil. Um einen klinischen Effekt zu erzielen, müssten daher deutlich höhere Zellzahlen transplantiert werden. Im Gegensatz zu diesen therapeutischen Aspekten stehen *in vitro* Metabolismus-Untersuchungen. Hierfür werden keine mit Hepatozyten fusionierenden

Stammzellen benötigt, sondern durch Transdifferenzierung entstandene Hepatozyten, oder Hepatozyten-ähnliche Zellen, die den in Tabelle 1 genannten Bedingungen entsprechen.

1.5.2 Strategien zur Aufklärung von Fusion und Differenzierung

Verschiedene Arbeitsgruppen haben seit 2002 versucht, formal zu zeigen, ob Stammzellen nach Transplantation überhaupt in der Lage sind, zu Hepatozyten zu transdifferenzieren, oder ob die Fusion von transplantierte Stammzelle und Hepatozyte der vorherrschende Mechanismus ist.

Terada et al. zeigten, dass murine Knochenmarksstammzellen *in vitro* spontan mit murinen embryonalen Stammzellen fusionieren können. Die fusionierten Knochenmarksstammzellen nahmen sukzessive einen Hepatozyten-ähnlichen Phänotyp an, was als echte Transdifferenzierung fehlinterpretiert werden könnte (Terada *et al.* 2002). Ein weiterer Hinweis auf Fusion von Stammzellen und Wirtszellen wurde von Ying et al. erlangt. In deren Experiment wurden embryonale Stammzellen mit transgenen murinen Hirnzellen, die eine Puromycinresistenz trugen, co-kultiviert. Anschließend wurde mittels Puromycin selektiert. Hierbei wurden mit einer Häufigkeit von 10^{-4} bis 10^{-5} fusionierte Zellen gefunden, die sowohl den transgenen Puromycin-Resistenzmarker als auch Chromosomen der embryonalen Stammzellen trugen (Ying *et al.* 2002).

Für das FAH^{-/-} - Mausmodell wurde von verschiedenen Gruppen (Vassilopoulos *et al.* 2003; Wang *et al.* 2003b; Willenbring *et al.* 2004) untersucht, ob Fusion oder Transdifferenzierung der transplantierten Zellen der zugrunde liegende Mechanismus ist. Wang et al. transplantierten hierzu Knochenmarksstammzellen weiblicher LacZ-transgener Mäuse mit FAH-Wildtyp in männliche FAH-defiziente Mäuse. Eine cytogenetische Analyse lieferte 80 XXXY Karyotypen, die durch Fusion zweier diploider Zellen hervorgegangen sind. Ferner wurden 120 XXXXY Karyotypen gefunden, die aus Fusion einer tetraploiden Wirtshepatozyte mit einer transplantierten diploiden Spenderzelle hervorgegangen sind (Wang *et al.* 2003b). Von Vassilopoulos et al. wurden ebenfalls Knochenmarksstammzellen aus FAH^{+/+} - Mäusen in FAH^{-/-} - Mäuse transplantiert und nach Explantation die genomische DNA der FAH-exprimierenden Leberknötchen analysiert. In den FAH-positiven Bereichen wurden mehr Allele des FAH^{-/-} - Wirts gefunden als Allele der FAH^{+/+} - Spenderknochenmarkszellen. Bei einer Transdifferenzierung der transplantierten Knochenmarkszellen zu Hepatozyten hätte in den FAH-exprimierenden Arealen vorwiegend Spender-DNA des Wildtyps vorliegen müssen (Vassilopoulos *et al.* 2003). Diesen Experimenten zufolge ist die der Fusion folgende Neuprogrammierung des Zellkerns von der Hepatozyte und nicht der fusionierenden Stammzelle dominiert. Zum einen war vor der Transplantation der hämatopoetische Oberflächen-

marker CD45 auf allen Knochenmarksstammzellen exprimiert, nach Fusion mit originären Hepatozyten aber nicht mehr. Weiterhin wurde vor der Transplantation in den Knochenmarksstammzellen keine FAH-mRNA exprimiert, sondern erst nach Fusion mit den FAH-defizienten Wirtshepatozyten (Vassilopoulos *et al.* 2003). Anhand der Expression dieser beiden Marker nach einer Zellfusion kann man vermuten, dass nach einer Fusion die Knochenmarksstammzelle von der Hepatozyte umprogrammiert wird. Dieser Rückschluss ist aufgrund des unterschiedlichen Zytoplasmaverhältnisses von Hepatozyte zu Knochenmarksstammzelle plausibel.

Bei den genannten Versuchen muss allerdings in Betracht gezogen werden, dass das FAH^{-/-}-Mausmodell die Fusion transplanteder Stammzellen begünstigt. Aufgrund des großen Selektionsvorteils von FAH^{+/+} gegenüber den defizienten Hepatozyten würde schon eine Fusion weniger Zellen zu großen FAH-positiven Arealen führen. Außerdem ist durch die geschädigte Mikroanatomie der FAH-defizienten Lebern einerseits und der gestörten zellulären Integrität andererseits die Fusion gegenüber der Transdifferenzierung wahrscheinlicher. So könnten die transplantierten Stammzellen an den Sinusoidzellen der Leber hängen bleiben und mechanisch mit den Hepatozyten, deren Zellmembranen geschädigt sind, in Berührung kommen (Theise 2003). Um den Einfluss des Selektionsdrucks des FAH-Modells auf die Fusion zu untersuchen, führten Alvarez-Dolado *et al.* Versuche an gesunden R26R-Mäusen durch, die vor der Transplantation letal bestrahlt wurden. Im verwendeten Modell trugen die transplantierten Knochenmarksstammzellen ein β -Actin-Cre-EGFP-Konstrukt, so dass in diesen Zellen konstitutiv Cre-Recombinase und EGFP (*engl. enhanced green fluorescent protein*) exprimiert wurde. In den R26R-Mäusen kommt es zur Expression des Reportergens LacZ, wenn durch Cre-Recombinase eine mit loxP-Sites flankierte Stopp-Kassette herausgeschnitten wird (Abbildung 2). Nach Transplantation der Knochenmarksstammzellen mit konstitutiv aktiver Cre-Recombinase kommt es erst nach Fusion von Stammzellen mit Hepatozyten zur Expression des Reportergens β -Galaktosidase. Mithilfe dieser Technik wurden zwei und vier Monate nach der Transplantation der transgenen β -Actin-Cre-EGFP-Knochenmarksstammzellen LacZ-exprimierende Zellen mit Hepatozyten-ähnlicher Morphologie gefunden. Zudem wurden keine LacZ-negativen, aber EGFP exprimierenden Hepatozyten beobachtet (EGFP war neben der Cre-Recombinase in den transplantierten Zellen konstitutiv aktiv). Alvarez-Dolado *et al.* konnten zeigen, dass auch ohne den Selektionsdruck des FAH-defizienten Lebermodells Fusion anstelle von Transdifferenzierung nach Transplantation muriner Stammzellen in murines Gewebe stattfindet (Alvarez-Dolado *et al.* 2003).

Bereits kurz nach Veröffentlichung dieser Ergebnisse kamen Harris et al. bei Verwendung einer ähnlichen Technik (Abbildung 2) zu dem Ergebnis, dass Transdifferenzie-

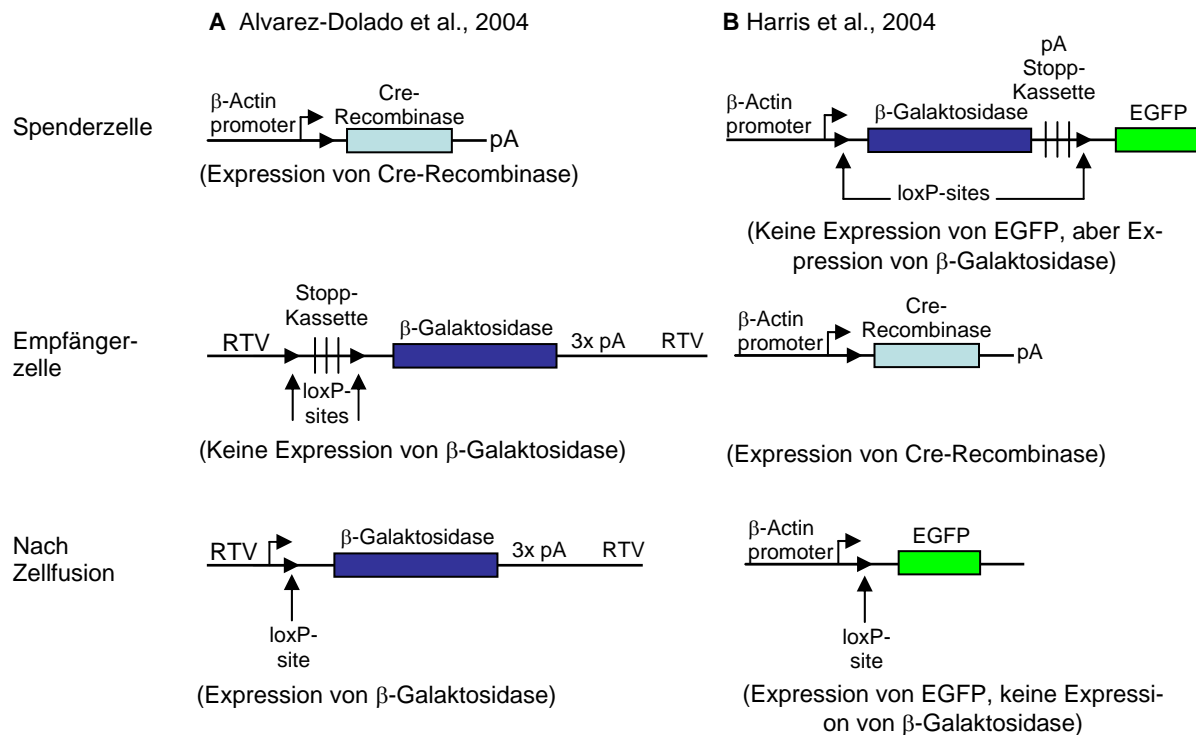


Abbildung 2: Zwei verschiedene experimentelle Ansätze, um zu klären, ob nach Transplantation von Stammzellen Fusion oder Transdifferenzierung stattfindet.

rung und nicht Fusion der zugrunde liegende Mechanismus ist (Harris *et al.* 2004). Auch von Harris et al. wurde ein loxP/Cre-Recombinase-Reportersystem verwendet, mit einem entscheidenden Unterschied zum bereits beschriebenen System. Anders als bei Alvarez-Dolado et al. enthalten die transplantierten Knochenmarksstammzellen das Reporterkonstrukt, während die Cre-Recombinase des Wirttieres konstitutiv aktiv ist (Abbildung 2A und B). Falls wie angenommen die Hepatozyte bei einer Fusion der dominierende Zelltyp ist (Vassilopoulos *et al.* 2003), könnten die Ergebnisse durch den unterschiedlichen Versuchsaufbau interpretierbar sein. Bei einer Fusion mit einer Hepatozyte könnte die Genexpression der transplantierten Stammzelle gesilenced werden. Im Ansatz von Alvarez-Dolado et al. wäre ein silencing der Expression der konstitutiv aktiven Cre-Recombinase nicht kritisch, da bereits eine kurze Phase der Cre-Expression ausreichend wäre, um das LacZ-Reporterkonstrukt zu aktivieren. Bei Harris et al. würde eine Fusion allerdings zu einem silencing des EGFP-Reporters der transplantierten Knochenmarkszellen führen. Um bei diesem Versuchsaufbau Fusion ausschließen zu können, müssten Positivkontrollen wie *in vitro* fusionierte Zellen (Hybridoma) aus Knochenmarkszellen und Hepatozyten hergestellt werden.

Andere Arbeitsgruppen kommen ferner zu dem Ergebnis, dass es vom transplantierten Zelltyp abhängig ist, ob Zellfusion oder Transdifferenzierung stattfindet. Von

Terada et al. wurde Fusion von murinen embryonalen Stammzellen mit mononukleären murinen Knochenmarksstammzellen beobachtet. Wurden indes SCA1⁺ Lin⁻ Stammzellen der hämatopoetischen Stammzellfraktion des Knochenmarks transplantiert, fand kein Anstieg der Häufigkeit fusionierter Zellen statt (Terada et al. 2002).

1.6 Transplantation humaner Stamm- und Vorläuferzellen ins Tiermodell

Eine große Zahl verschiedener Arbeitsgruppen (Beerheide et al. 2002; Danet et al. 2002; Almeida-Porada et al. 2004; Ishikawa et al. 2003; Kakinuma et al. 2003; Kogler et al. 2004; Kollet et al. 2003; Newsome et al. 2003; Ruhnke et al. 2005c; Turrini et al. 2005; von Mach et al. 2004; Wang et al. 2003b) hat das Schicksal humaner Stamm- und Vorläuferzellen verschiedener Quellen nach Transplantation in Versuchstiere untersucht. Am häufigsten wurden die Transplantationen in immundefiziente SCID- (*engl. severe combined immunodeficiency*) oder NOD/SCID- (*engl. nonobese diabetic SCID*) Mäuse durchgeführt. Kogler et al. und Almeida-Porada et al. führten die Experimente an Schafen durch. Die Transplantation ins Tiermodell hat gegenüber den *in vitro* Differenzierungs-Versuchen den Vorteil, dass den transplantierten Zellen zur Entwicklung die gesamte Mikroumgebung der Leber mit allen Wachstumsfaktoren, der Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff und anatomischen Gegebenheiten zur Verfügung steht. Der prinzipielle Nachteil all dieser *in vivo* Studien ist, dass die Gefahr von Speziesinkompatibilitäten besteht, z.B. könnten Wachstumsfaktoren der Maus in murinen Zellen andere Signalwege als in humanen Zellen auslösen. Auch sind die so erhaltenen Ergebnisse nicht ohne weiteres auf den Menschen zu übertragen, da Immunreaktionen auf die transplantierten Zellen auftreten können, die beim immundefizienten Tiermodell nicht vorhergesagt werden können.

Obgleich verschiedene Versuchstierspezies, Transplantationstechniken und humane Stammzelltypen getestet wurden, sind die erhaltenen Ergebnisse sehr ähnlich. Meist wurde in den Studien die Bildung humanen Albumins entweder mit immunhistochemischen Methoden, mittels RT-PCR, oder beiden Techniken nachgewiesen (Beerheide et al. 2002; Wang et al. 2003b; Kollet et al. 2003; Kakinuma et al. 2003; von Mach et al. 2004; Turrini et al. 2005; Almeida-Porada et al. 2004; Kogler et al. 2004). Als weiterer immunhistochemisch nachweisbarer Faktor wurde das humane Hepatozyten-spezifische Antigen (HepPar1, Klon OCH15B) zum Detektieren der transplantierten Stammzellen eingesetzt (Ishikawa et al. 2003; Danet et al. 2002; Newsome et al. 2003).

1.7 Fusion oder Differenzierung humaner Stammzellen *in vivo*

Nach Transplantation muriner Stammzellen beispielsweise ins FAH^{-/-}-Modell wurde gezeigt, dass eher Fusion als Differenzierung der transplantierten Zellen eintritt. Obgleich auch eine Fusion humaner Stammzellen mit Hepatozyten für eine spätere klinische Anwendung vielversprechend ist, wurde vielfach untersucht, ob humane Stammzellen in der Lage sind, zu Hepatozyten zu differenzieren. Hierzu wurde von Newsome et al. eine Transplantation mononukleärer Zellen des Nabelschnurbluts in NOD/SCID-Mäuse durchgeführt. Mit einer FISH (*engl. fluorescence in situ hybridization*) mit Sonden für Mensch- und Maus-DNA konnte in dieser Studie kein Hinweis auf Fusion gefunden werden (Newsome et al. 2003). Da nach Transplantation muriner Stammzellen Fusion gezeigt wurde (Vassilopoulos et al. 2003; Alvarez-Dolado et al. 2003; Wang et al. 2003b; Willenbring et al. 2004), besteht die Möglichkeit, dass sich humane Stammzellen nach Transplantation anders als murine Zellen verhalten. Darüber Aufschluss geben könnten Experimente nach dem Modell von Alvarez-Dolado et al., die aber mit humanen Stamm- und Vorläuferzellen noch nicht durchgeführt wurden.

1.8 Charakterisierung differenzierter humaner Stammzellen *in vivo*

Ob durch Differenzierung humaner Stammzellen in der Mausleber humane Hepatozyten oder Hepatozyten-ähnliche Zellen entstanden sind, könnte durch die in Tabelle 1 genannten Parameter beantwortet werden. *In vivo* wurden in den transplantierten Zellen zwar Hepatozyten-Faktoren wie humanes Albumin nachgewiesen. Nicht zuletzt wegen methodischer Schwierigkeiten ist jedoch die Frage unbeantwortet, ob diese Zellen einen Metabolismus aufweisen, der ähnlich dem echter Hepatozyten ist. So werden in der Literatur die Standpunkte vertreten, dass diese Zellen als Hepatozyten bezeichnet werden können (Kakinuma et al. 2003; Almeida-Porada et al. 2004), von der Mehrheit werden diese Zellen kritischer diskutiert und als Hepatozyten-ähnliche Zellen bezeichnet (Newsome et al. 2003; Beerheide et al. 2002; Ishikawa et al. 2003; von Mach et al. 2004). Eine eingehende Analyse spezialisierter Hepatozytenfunktionen wird durch die übereinstimmend in beinahe allen publizierten Studien berichtete geringe Zahl humaner Zellen erschwert. Ausnahme hierbei ist die von Kogler et al. in Schafen durchgeführte Studie, wo in bis zu 20% der Leberzellen die Expression humanen Albumins nachgewiesen wurde. Durch Perfusion und FACS-Analyse (*engl. fluorescence activated cell sorting*) sollte es bei einem solchen Anteil möglich sein, die humanen Zellen in ausreichender Anzahl zu isolieren, um funktionelle Untersuchungen durchführen zu können.

1.9 *In vitro* Differenzierung humaner extrahepatischer Stammzellen

Neben den angesprochenen *in vivo* Transplantationen wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen Versuche unternommen, extrahepatische Stamm- und Vorläuferzellen *in vitro* zu Hepatozyten zu differenzieren. Durch Kombination verschiedener Wachstumsfaktoren und -bedingungen (O_2 -Konzentration, Matrices) wurde die Differenzierung der humanen Stammzellen bewirkt. Je nach Bericht wurden den so generierten Zellen metabolische Eigenschaften zugesprochen, die denen humaner Hepatozyten entsprechen. Schwartz et al. berichteten 2002 von aus dem Knochenmark gewonnen multipotenten adulten Vorläuferzellen (MAPC, engl. *multipotent adult progenitor cells*), die *in vitro* zu mesodermalen und neuroectodermalen Zellen differenzieren können, darüberhinaus *in vivo* zu allen embryonalen Linien (Schwartz et al. 2002). Bei den MAPCs handelte es sich um jeweils aus Mensch, C57BL6-Maus und Sprague-Dawley-Ratte isolierte adhärent proliferierende $CD44^+$, $CD45^-$, HLA I $^+$, HLA II $^-$ und c-kit $^+$ Zellen, bezeichnet als hMAPC, mMAPC und rMAPC. Kultiviert wurden diese Zellen auf 1% Matrigel mit einem DMEM-Medium, welches 10ng/mL FGF-4 (engl. *fibroblast growth factor*) und 20ng/mL HGF (engl. *hepatocyte growth factor*) enthielt. Nach vierzehntägiger Kultur mit dem Differenzierungsmedium exprimierten 60% der rMAPCs und mMAPCs, sowie 90% der hMAPCs Albumin. Diese Zellen wurden im PROD-Assay (Pentoxyl-resorufin-*O*-dealkylase) vor und nach viertägiger Induktion mit 1mM Phenobarbital untersucht. Durch den PROD-Assay werden vor allem die Cytochrom P450 (CYP) Isoenzyme der CYP2B-Familie erfasst, die sich durch Phenobarbital in ihrer Aktivität um ein Vielfaches induzieren lassen. Im Vergleich zu primären Hepatozyten, deren CYP2B-Aktivität nach 4d Induktion mit 1mM Phenobarbital um mehr als den Faktor 10 ansteigt (Hengstler et al. 2000a; Hengstler et al. 2000b; Ringel et al. 2002; Wortelboer et al. 1991), wurde von Schwarz et al. eine Zunahme der CYP2B-Aktivität der MAPCs um den Faktor 1,3 bis 1,4 erreicht (Schwartz et al. 2002). Trotzdem wurden diese Zellen als funktionelle Hepatozyten-ähnliche Zellen bezeichnet (Schwartz et al. 2002). Dies zeigt, dass mit diesem Begriff in der Vergangenheit etwas leichtfertig umgegangen wurde. Hinsichtlich der CYP2B-Isoformen ist außerdem zu bemerken, dass diese auch in anderen Geweben exprimiert werden. So wird CYP2B9 bei Ratten im Gehirn (Miksys et al. 2000), bei Mäusen im Darmepithel (Zhang et al. 2003) und CYP2B6 beim Menschen in Lunge, Speiseröhre und Mucosa (Ding & Kaminsky 2003; Hukkanen et al. 2000) exprimiert. Somit sind sie keine strikt Hepatozyten-spezifische Enzymfamilie. Gleiches gilt für die Induktion von CYP2B-Isoenzymen durch Phenobarbital, die auch in Darmepithelzellen von Maus und Ratte sowie weißem Fettgewebe der Ratte (Zhang et al. 2003) möglich ist. Die Induzierbarkeit von CYP2B-Isoenzymen stellt demnach kein alleiniges Merkmal von Hepatozyten dar.

Ein besonderes Verfahren, um *in vitro* Stammzellen zu differenzieren, wurde von Jang et al. berichtet. In Transwell-Schalen wurden hämatopoetische Stammzellen zusammen mit geschädigtem Lebergewebe einer C57/BL6-Maus co-kultiviert und zu Leberzellen differenziert. Nach 48h wurde in 2 - 3% der aufgereinigten Stammzellen Albumin und Cytokeratin 18 (CK18) gefunden. Ebenso wurden in der aus von den hämatopoetischen Stammzellen abstammenden Population verschiedene Lebertranskriptionsfaktoren und cytoplasmatische Proteine wie α -Fetoprotein, HNF (*engl. hepatocyte nuclear factor*)-4, HNF-3 β und HNF-1 α nachgewiesen, die auch in sich entwickelnden Hepatozyten zu finden sind. Die Expression von α -Fetoprotein nahm mit der Zeit ab, die der anderen Marker zu, ein Zeichen für eine weitergehende Differenzierung der Stammzellen in Richtung Hepatozyte. Zwar wurden in diesem mehrstufigen Protokoll Zellen gewonnen, die bereits eine Vielzahl an Hepatozytenmarkern bilden, jedoch ist die absolute Menge an differenzierten Zellen sehr gering. Durch eine intravenöse Transplantation der aufgereinigten Zellen in Mäuse mit CCl₄-geschädigten Lebern wurde von Jang et al. bereits nach 7d eine Verbesserung der Leberfunktion beobachtet (Jang *et al.* 2004).

Neben den hier genannten Studien haben sich noch weitere Gruppen mit der *in vitro* Differenzierung von humanen Stamm- und Vorläuferzellen befasst. Zulewski et al. kultivierten adhärent proliferierende Nestin-positive hepatopankreatische Vorläuferzellen aus humanen pankreatischen Inselzellen in serumfreiem Medium mit Zusatz von 10 μ M Dexamethason. Unter diesen Bedingungen konnte mittels RT-PCR die Expression von HGF, c-met, α -Fetoprotein, E-Cadherin und Transthyretin nachgewiesen werden (Zulewski *et al.* 2001). Avital et al. isolierten aus dem Knochenmark β_2 -Microglobulin⁻, Thy1⁺ Zellen, die mit Hepatozyten aus cholestatischen Rattenlebern in einer Transwell-Schale mit Zusatz von 5% cholestatischem Serum auf Matrigel co-kultiviert wurden. Die Knochenmarkszellen differenzierten unter diesen Kulturbedingungen so, dass sie in der Lage waren, Harnstoffzyklus zu betreiben und Albumin sowie die Transkriptions-Faktoren HNF1 und HNF4 zu bilden (Avital *et al.* 2001). Mittels RT-PCR wurde von Fiegel et al. die Bildung von Albumin und Cytokeratin 19 (CK19) in CD34⁺ Knochenmarksstammzellen nachgewiesen, nachdem diese auf Kollagen-beschichteten Zellkulturschalen zusammen mit HGF, EGF (*engl. epidermal growth factor*), bFGF (*engl. basic fibroblast growth factor*) und Insulin kultiviert wurden (Fiegel *et al.* 2003). Ein mehrstufiges Protokoll zur *in vitro* Differenzierung adhärent proliferierender Knochenmarks- und Nabelschnurblutzellen wurde von Lee et al. im Jahr 2004 angewendet. Zunächst wurden die Zellen für 2d in serumfreiem Medium in Gegenwart von EGF und bFGF kultiviert. Im Anschluss wurde für weitere 7d mit Zusätzen von HGF,

bFGF und Nicotinamid kultiviert, dem folgend mit Oncostatin M, Dexamethason und ITS (einer Mischung aus Insulin, Transferrin und Selen). Als Folge dieses Mehrstufenprotokolls wurde in der Zellpopulation mittels RT-PCR die Expression von α -Fetoprotein und Glucose-6-phosphatase, Thyrosinaminotransferase, CK18, Tryptophan-2,3-dioxygenase und CYP2B6 nachgewiesen. Neben diesen Parametern zeigten die Zellen qualitativ Albuminproduktion, Harnstoffsekretion und Aufnahme von LD-Lipoproteinen (*engl. low density*) (Lee *et al.* 2004).

1.10 *In vitro* Differenzierung peripherer Blutmonozyten

Neben den oben diskutierten extrahepatischen Stammzellen sind periphere Blutmonozyten eine weitere mögliche Quelle für *in vitro* generierte Hepatozyten-ähnliche Zellen. Periphere Blutmonotzyten können durch Kultur in geeigneten Medien in einen dedifferenzierten Zustand überführt werden. Durch geeignete Kulturmedien können die programmierbaren, dedifferenzierten Zellen zu Hepatozyten-ähnlichen Zellen differenziert werden. Die Verwendung peripherer Blutmonozyten hat gegenüber der Verwendung von Stammzellen verschiedene Vorteile; die programmierbaren Zellen können immer und in großer Menge generiert werden und dann *in vitro* zur Hepatozyte differenziert werden. Solche bereits ausdifferenzierten Zellen könnten dann beispielsweise für Zell-basierte Therapien monogenetischer Lebererkrankungen eingesetzt werden (Nussler *et al.* 2006). Hierbei wären dann autologe Transplantationen möglich.

Verschiedene Arbeitsgruppen haben Versuche zur Dedifferenzierung peripherer Blutmonozyten und deren Differenzierung zu Hepatozyten durchgeführt (Ruhnke *et al.* 2005c; Ruhnke *et al.* 2005a; Zhao *et al.* 2003). Die Gewinnung der mononukleären Zellen (MNCs, *engl. mononuclear cells*) wurde bei allen drei Studien durch eine Dichtegradienten-Zentrifugation von Buffycoats durchgeführt. Zhao *et al.* inkubierten die adhärent wachsenden MNCs mit RPMI-Medium unter Zugabe von M-CSF (*engl. macrophage colony stimulating factor*). Nach 14d wurden Fibroblasten-artige Zellen beobachtet. Für die nächsten 5 - 7d erfolgte eine Inkubation mit HGF, woraufhin in 75 - 81% der Zellen immunhistochemisch Albumin und α -Fetoprotein nachgewiesen wurde (Zhao *et al.* 2003). Durch sechstägige Kultur peripherer Blutmonozyten in einem Differenzierungsmedium mit Zusatz von M-CSF und IL-3 wurden von Ruhnke *et. al* programmierbare Zellen gewonnen. Diese Zellpopulation wurde durch spezielle Kulturmedien entweder zu Hepatozyten-ähnlichen Zellen oder zu Inselzellen-ähnlichen Zellen differenziert. Die ausdifferenzierten Zellen ließen sich allerdings nicht mehr ineinander überführen, so dass, wenn die Zelle vom programmierbaren Zustand aus differenziert ist, ein „point-of-no-return“ überschritten ist (Ruhnke *et al.* 2005c). *In vitro*

wurden diese Zellen von Ruhnke et al. quantitativ mit primären Hepatozyten verglichen. Hierbei zeigten sie eine Albumin- und Harnstoffbildung, die der humaner Hepatozyten entspricht. Im ECOD (Ethoxycoumarin-*O*-dealkylase)-Assay, ein summarischer Parameter für CYP1A, CYP2B1, CYP1B2, CYP2B6, CYP2C6, CYP2C7, CYP2C11, CYP2C13 und CYP2E1, zeigten die Neohepatozyten sowohl basal als auch nach Induktion mit 2,5µM 3-MC (3-Methylcholanthren) eine primären humanen Hepatozyten vergleichbare Aktivität, gleiches gilt für die 4-MU (4-Methylumbelliferon)-UDP-Glucuronidierung, ein Assay zum Phase II-Metabolismus (Ruhnke *et al.* 2005c). Allerdings ist die CYP3A4-Aktivität, bestimmt durch die 6β-Hydroxilierung von Testosteron, um etwa den Faktor 100 niedriger als bei primären humanen Hepatozyten. Mit Rifampicin war nur eine schwache CYP3A4-Induktion möglich.

2 Material

Sofern nicht anders angegeben, waren alle verwendeten Chemikalien p.A. Qualität (pro analysi, für die Analyse). In der Zellkultur verwendete Lösungen waren für Zellkultur getestet oder wurden vor Gebrauch steril filtriert.

2.1 Zellkultur

2.1.1 Zellkulturmedien

2.1.1.1 Medium zur Gewinnung adhärent proliferierender Nabelschnurblutzellen

500mL	DMEM low Glucose, mit Phenolrot und stabilisiertem L-Glutamin (2mM)	PAN Biotech
30%	Fetales Kälberserum (Seraplast)	PAN Biotech
100U/mL	Penicillin	PAN Biotech
0,1mg/mL	Streptomycin	PAN Biotech
100nM	Dexamethason	Sigma-Aldrich

2.1.1.2 Medium zur Kultur der Nabelschnurblutzellen und Primärhepatozyten

500mL	William's Medium E, mit Phenolrot und stabilisiertem L-Glutamin (2mM)	PAN Biotech
10%	Fetales Kälberserum (Seraplast)	PAN Biotech
100U/mL	Penicillin	PAN Biotech
0,1mg/mL	Streptomycin	PAN Biotech
100nM	Dexamethason	Sigma-Aldrich

2.1.1.3 Dedifferenzierungsmedium zur Dedifferenzierung der Blutmonozyten

500mL	RPMI1640, ohne Phenolrot	Invitrogen
10%	Humanes Albumin	Invitrogen
100U/mL	Penicillin	Invitrogen
0,1mg/mL	Streptomycin	Invitrogen
2mL	L-Glutamin	Invitrogen

140µM	β-Mercaptoethanol	Carl-Roth
5ng/mL	M-CSF	R&D Systems
0,4ng/mL	IL-3	R&D Systems

2.1.1.4 Differenzierungsmedium zur Generierung der Neohepatozyten

500mL	RPMI1640, ohne Phenolrot	Invitrogen
10%	Fetales Kälberserum	Invitrogen
100U/mL	Penicillin	Invitrogen
0,1mg/mL	Streptomycin	
2mL	L-Glutamin	Invitrogen
140µM	β-Mercaptoethanol	Carl-Roth
3ng/mL	FGF4	R&D Systems

2.1.1.5 Medium zur Kultur hepatopankreatischer Vorläuferzellen

500mL	RPMI1640, mit Phenolrot und stabilisiertem L-Glutamin	Gibco
10%	Fetales Kälberserum (Seraplast)	PAN Biotech,
100U/mL	Penicillin	PAN Biotech,
0,1mg/mL	Streptomycin	
1mM	Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich
50µM	β-Mercaptoethanol	Carl-Roth
10mM	HEPES	Carl-Roth
20ng/mL	bFGF	PAN Biotech
20ng/mL	EGF	PAN Biotech

2.1.2 PBS-Waschpuffer (nach Dulbecco) einfach konzentriert

0,2g	KCl	Carl-Roth
0,2g	KH ₂ PO ₄	Carl-Roth
8,0g	NaCl	Carl-Roth

2,3g	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	Carl-Roth
------	---	-----------

Mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ auf 1L auffüllen, pH auf 7,4 einstellen und vor Gebrauch autoklavieren.

2.1.3 Trypanblau

0,4g	Trypanblau	Sigma-Aldrich
------	------------	---------------

Mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ auf 100mL auffüllen und in 1,5mL Eppendorfg Gefäße aliquotieren. Lagerung bei 4°C.

2.1.4 Kollagen

1,5g	Sehnenstränge aus Rattenschwänzen (ca.5)
------	---

Dreimaliges Waschen mit je 400mL 10%iger NaCl-Lösung für 2 bis 4 Wochen. Danach dreimaliges Waschen mit je 400mL 0,06M K_2HPO_4 für 2 bis 4 Wochen. Dem anschließend eine 1 bis 2 wöchige Lipidextraktion mit 400mL Diethylether. Innerhalb von 3 bis 4 Tagen werden die Schwänze unter ständigem Rühren in Essigsäure aufgelöst. Diese Lösung wird 1:8 mit autoklaviertem Wasser verdünnt und filtriert. Mit Sirius-Red (50µM in 0,5M Essigsäure) wird die Kollagen-Konzentration gegen Wasser bei 540nm fotometrisch bestimmt. Der optimale Bereich liegt zwischen 250 und 300µg Kollagen/mL.

2.1.5 Weitere Chemikalien und gebrauchsfertige Lösungen für die Zellkultur

Biocoll-Lösung (Dichte 1,077g/cm ³)	Biochrom
0,05% Trypsin / 0,02% EDTA	PAN Biotech
10fach konzentriertes Trypsin	PAA
DMSO	Carl-Roth
CM-DiI	Molecular Probes
Qdot655 Cell labeling Kit	Molecular Probes

2.1.6 Materialien und Geräte in der Zellkultur

2.1.6.1 Verwendete Zellkulturflaschen

a) Für adhärent proliferierende Nabelschnurblutzellen, hepatopankreatische Vorläuferzellen

25cm ² Zellkulturflasche	Costar
75cm ² Zellkulturflasche	Greiner

b) Für Neohepatozyten

75cm ² Zellkulturflasche	Sarstedt
-------------------------------------	----------

6-Well Platte

Greiner

c) Für primäre Hepatozyten75cm² Zellkulturflasche

Greiner

Am Tag vor dem Versuch wurden die Flaschen mit Kollagen beschichtet. Vor Gebrauch wurde das Kollagen abgenommen, und die Flasche zwei Mal mit PBS nachgespült.

2.1.6.2 Geräte in der Zellkultur

Zentrifuge

Hettich Rotina 35R

2.2 Transplantation, Explantation und Einbetten**2.2.1 Versuchstiere**

SCID-Mäuse

Charles-River

NOD/SCID-Mäuse

Medizinisch Experimentelles
Zentrum der Universität Leipzig**2.2.2 Narkose und Lösungen**

Ketamin

Ratiopharm

Rompun

Bayer

Diethylether

Carl-Roth

Pentobarbital

Apotheke Uniklinik Leipzig

Heparin

Ratiopharm

4%iges gepuffertes Formalin

Apotheke Uniklinik

2.2.3 Materialien und Geräte

Insulinspritze 1mL

BD Plastikbrand

Kanüle, 26 Gauge (0,45x13mm)

BD Microlance

Chirurgisches Nahtmaterial, Perma Handseide,
nicht resorbierbar 5-0 (Ph.Eur) PS-2 19,0mm, Fa-
den 45cm

Ethicon

Chirurgisches Einmalskalpell #11

Braun

Peristaltische Pumpe

Desaga

Gewebeentwässerungs- und Einbettautomat VIP5

Bavimed

Schlittenmikrotom HM400R	Mikron
SuperfrostPlus Objektträger	Menzel

2.3 Immunhistochemie und *in situ* Hybridisierung

2.3.1 Wasch- und Aufschlusspuffer, wässrige Eindeckmittel

2.3.1.1 TBS-Waschpuffer, zehnfach konzentriert

265g	NaCl	Carl-Roth
60g	Tris	Carl-Roth

Mit H_2O_{dest} auf 5L auffüllen. Der pH-Wert wird auf 7,4 eingestellt.

2.3.1.2 Citrat-Aufschlusspuffer

Lösung A

4,2g	Citronensäure	Carl-Roth
------	---------------	-----------

Mit H_2O_{dest} auf 200mL auffüllen. Lagerung bei 4°C.

Lösung B

2,9g	Natriumcitrat	Carl-Roth
------	---------------	-----------

Mit H_2O_{dest} auf 1000mL auffüllen. Lagerung bei 4°C.

Der Aufschlusspuffer wird unmittelbar vor Gebrauch angesetzt. Hierzu werden 4,5mL Lösung A und 20,5mL Lösung B mit H_2O_{dest} auf 250mL aufgefüllt.

2.3.1.3 SSC-Puffer, zwanzigfachkonzentriert

175g	NaCl	Carl-Roth
86g	Natriumcitrat	Carl-Roth

Mit H_2O_{dest} auf 1L auffüllen. Der pH-Wert wird auf 7,0 eingestellt.

2.3.1.4 Mowiol zum wässrigen Eindecken in der Fluoreszenzmikroskopie

6g	Glycerol für die Mikroskopie	Merck
2,4g	Mowiol 4-88	Sigma-Aldrich
12mL	TBS-Puffer (pH8,0)	
6mL	H_2O_{dest}	

Die Lösung wurde 4h bei RT auf dem Magnetrührer gerührt, danach 2h ohne zu rühren bei RT stehen gelassen. In einem 50°C Wasserbad wurde die Lösung für 10min inkubiert, dann 15min bei 2800g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pipette vorsichtig abge-

nommen und in 1,5mL Eppendorf-Gefäße aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C. Vor der Anwendung wurden die benötigte Anzahl an Aliquots bei maximal 50°C im Heizblock aufgetaut.

2.3.2 Antikörper in der Immunhistochemie

α -humanes Albumin, aus Kaninchen	Abcam
Vectastain Elite ABC-Kit (α -Kaninchen, aus Ziege)	Vectorlabs
α -Kaninchen, Cy3-konjugiert, aus Esel	Dianova
α -murines Albumin, FITC-konjugiert, aus Ziege	Bethyl
HepPar, Clone OCH1E5	Dako
Animal Research Kit	Dako

2.3.3 Sonden und Antikörper in der *in situ* Hybridisierung

Sonde gegen <i>Alu</i> -Sequenzen, FITC-konjugiert	Biogenex
α -Fluorescein, biotinyliert, aus Ziege	Vectorlabs
Streptavidin-Cy2	Dianova
Sonde gegen Mouse-major-satellite-DNA, Digoxigenin-konjugiert	Prof. Brüstle, Universität Bonn
α -Digoxigenin-Cy3	Dianova

2.3.4 Weitere Chemikalien

Rotihistol	Carl-Roth
Wasserstoffperoxid, 35%, rein	Carl-Roth
BSA (Rinderserumalbumin)	Carl-Roth
Avidin- / Biotinblocking-Kit	Vectorlabs
DAB (Diaminobenzidin)	Dako
Mayers Hämalaun	Merck
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol)	Molecular Probes
Entellan (mit Toluol)	Merck

Ethanol	J.T. Baker
Methanol	J.T. Baker

2.3.5 Materialien und Geräte

Fixogum	Marabu
Hybridizer	Dako
DakoCytomationPen (Fettstift)	Dako

2.4 Histologische Standardfärbungen

2.4.1 Berliner-Blau-Reaktion

Kaliumhexacyanoferrat(II)	Apotheke Uniklinik Leipzig
Salzsäure	Carl-Roth
Kernechtrot	Apotheke Uniklinik Leipzig

2.4.2 PAS-Färbung

Oxidationslösung

1g	Periodsäure	Carl-Roth
----	-------------	-----------

Mit 70mL Ethanol, 20mL 0,1M Natriumacetat und 10mL H_2O_{dest} lösen. Die Lösung ist im Dunkeln bei RT für eine Woche haltbar.

Reduktionslösung

2g	Kaliumiodid	Carl-Roth
2g	Natriumthiosulfat	Carl-Roth

Mit 60mL Ethanol, 40mL H_2O_{dest} und 2mL 1M HCl lösen. Die Lösung ist eine Woche bei RT haltbar.

Schiff'sches Reagenz - Lösung A

1g	Basisches Fuchsin	Carl-Roth
----	-------------------	-----------

Mit 30mL 1M HCl lösen.

Schiff'sches Reagenz - Lösung B

1g	Kaliumdisulfit	Carl-Roth
----	----------------	-----------

Mit 170mL H_2O_{dest} lösen.

Zum Ansetzen der Gebrauchslösung des Schiff'schen Reagenzes wurden 30mL der Lösung

A mit 170mL der Lösung B versetzt. Die Lösung wurde 24h stehen gelassen, und anschließend mit 600mg Aktivkohle versetzt. Nach zweimaliger Filtration über ein Faltenfilter wurde die geklarte Lösung kühl gelagert einige Wochen verwendet.

Natriumacetat	Carl-Roth
Aktivkohle	Carl-Roth

2.5 Mikroskop

2.5.1 Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie

BX41-Mikroskop mit Fluoreszenzeinrichtung	Olympus
Cy2-Filterblock U-MNIBA-2	Olympus
Cy3-Filterblock U-MNG-2	Olympus
DAPI-Filterblock U-MWU-2	Olympus
ColorViewII-Kamera	Soft Imaging System
analySIS^B, Version 5.0, Build 1067	Soft Imaging System

2.5.2 Konfokale Mikroskopie

LSM510 Meta	Zeiss
Software LSM5, Revision 3.5	Zeiss

2.6 PCR-Untersuchungen

2.6.1 Pufferlösungen

2.6.1.1 TE-Puffer (Tris / EDTA-Puffer), einfachkonzentriert

1,57g	Tris	Carl-Roth
0,29g	EDTA	Carl-Roth

Mit H_2O_{dest} auf 1L auffüllen.

2.6.1.2 TBE-Puffer (Tris / Borat / EDTA-Puffer), einfachkonzentriert

10,8g	Tris	Carl-Roth
5,6g	Borsäure	Carl-Roth
0,94g	EDTA	Carl-Roth

Mit H_2O_{dest} auf 1L auffüllen.

2.6.1.3 Bromphenolblau Ladepuffer

1 Teil	Glycerin	Carl-Roth
1 Teil	TBE-Puffer	siehe 2.6.1.2
Spatel- spitze	Bromphenolblau	Carl-Roth

Nach dem Lösen in 1,5mL Eppendorf-Gefäße aliquotieren.

2.6.2 Primer

3-4FOR	gtaaccctcggttctgct	MWG
3-4REV	tggtacacacatgcactgga	MWG

Mit RNase-freiem Wasser entsprechend dem Datasheet verdünnen.

2.6.3 Weitere Chemikalien

PureGene DNA Purification Kit	Gentra
Kalbsthymus-DNA	Sigma-Aldrich
Agarose	Carl-Roth
Ethidiumbromid	Invitrogen
DEPC treated water (RNase- und DNase-frei)	Invitrogen
Taq-PCR-Mastermix	Qiagen
PCR 100bp Low Ladder	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Carl-Roth

2.6.4 Geräte

Fotometer V530	Jasco
Mikro-Quartzküvette	Hellma
Elektrophorese-Apparatur Renner 500/500	Renner
Gelkammern	Biozym
Tischzentrifuge Minispin plus	Eppendorf
Eispack	Eppendorf
Thermocycler T3000	Biometra

2.7 Induktionsversuche

2.7.1 Chemikalien

3-Methylcholanthren	Sigma-Aldrich
Phenobarbital	Apotheke Uniklinik Leipzig
7-Ethoxyresorufin	Sigma-Aldrich
Resorufin	Sigma-Aldrich

2.7.2 Materialien und Geräte

Fluorimeter FP-730	Jasco
Plastikküvetten	Brand

3 Methoden

3.1 Gewinnung und Aufbereitung der Stamm- und Vorläuferzellen

3.1.1 Adhärenz proliferierende Nabelschnurblutzellen

Adhärenz proliferierende Zellen aus Nabelschnurblut wurden, wie von Beerheide et al. (Beerheide *et al.* 2002) beschrieben mit dem Einverständnis der Mütter nach der Geburt gewonnen und aufgearbeitet. Während sich die Plazenta noch in der Gebärmutter befand, wurde die Nabelschnur an zwei Stellen abgeklemmt und ca. 7 – 10cm vom Nabel entfernt abgetrennt. Nach Desinfektion der Nabelschnur wurde die Nabelschnurvene punktiert und das Nabelschnurblut in speziellen Citratphosphatdextrose gefüllten Röhrchen gesammelt, um Koagulation des Blutes zu verhindern. Dabei wurden ca. 50mL Nabelschnurblut gewonnen. Das Citratblut wurde anschließend mit einem gleichen Volumen an phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, *engl. phosphate buffered saline*) verdünnt und vorsichtig einer Biocoll-Lösung (Dichte 1,077g/cm³, Fa. Biochrom) überschichtet. In einer Dichtegradienten-Zentrifugation mit 450g für 25min bei Raumtemperatur (RT) und ausgeschalteter Zentrifugenbremse wurden die mononukleären Zellen (MNC, *engl. Mononuclear Cells*) aus der weißen Interphase vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und in einem getrennten Gefäß gesammelt. Nach 10min Zentrifugieren (400g, eingeschaltete Zentrifugenbremse, RT) der gesammelten MNCs wurde der Überstand verworfen und das Pellet in PBS resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde ein zweites Mal wiederholt. Anschließend wurden 70 x 10⁶ Zellen pro 25cm² Zellkulturflasche (Fa. Costar) mit einem speziellen Kulturmedium auf der Basis von DMEM (DMEM low Glucose und 2mM L-Glutamin; Fa. PAN Biotech), 30% Fetalem Kälberserum (FCS, *engl. fetal calf serum*; Seraplast, Fa. PAN Biotech), 100nM Dexamethason (Fa. Sigma-Aldrich), 100U/mL Penicillin (Fa. PAN Biotech) und 0,1mg/mL Streptomycin (Fa. PAN Biotech) ausgesät. Die Kultur der Flaschen wurde in einem Inkubator mit 5% CO₂ und 95% Luftfeuchte bei 37°C durchgeführt. Durch regelmäßige Medienwechsel zwei Mal die Woche wurden nicht-adhärenz Zellen entfernt. Nach 10 – 25d waren Kolonien von adhärenz wachsenden Zellen mit Fibroblasten-artiger Morphologie zu erkennen (Abbildung 3A). Zu diesem Zeitpunkt wurde das Medium quantitativ entfernt und die Kulturflasche zwei Mal mit PBS nachgespült. Um die Kolonien abzulösen, wurden etwa 2mL 0,05% Trypsin/0,02% EDTA (Fa. PAN Biotech) auf die Zellen pipettiert und die Kulturflasche dann bei 37°C im CO₂-Brutschrank inkubiert, bis sich die Nabelschnurblutzellen ablösen. Das Trypsin wurde zu diesem Zeitpunkt durch Zugabe von 10mL Zellkulturmedium abgestoppt. Diese Zellsuspension wurde in eine neue 25cm²-Kulturflasche ausgesät. Wurden die Zellen in dieser Flasche kon-

fluent, erkennbar durch eine gekämmte Fibroblasten-artige Morphologie, wurde erneut das Kulturmedium quantitativ entfernt, die Zellen wie beschrieben abtrypsinisiert und im Verhältnis 1:3 in 75cm²-Kulturflaschen (Greiner) weiter passagiert. Diese Passage wurde als Passage 1 definiert. Zur Weiterkultur wurde ein spezielles Kulturmedium auf der Basis von William's Medium E (WME, Fa. PAN Biotech) mit 10% FCS, 100nM Dexamethason, 100U/mL Penicillin und 0,1mg/mL Streptomycin verwendet. Wurden die 75cm²-Flaschen konfluent, wurden zwei im Verhältnis 1:5 in neue 75cm²-Flaschen weiterkultiviert, eine wurde im Verhältnis 1:5 in fünf Kryovials kryokonserviert. Dazu wurden die Zellen dieser Flasche wie beschrieben abtrypsinisiert, die Zellsuspension für 10min bei 400g und RT herunterzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in FCS mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO; Fa. Carl-Roth) resuspendiert und auf fünf Kryovials aliquotiert. In einer kooperierenden Arbeitsgruppe (Dr. D. Spitkovsky, Universität Köln) wurden die adhärent proliferierenden Nabelschnurblutzellen im FACS für bestimmte CD-Marker (CD, *engl. cluster of differentiation*) charakterisiert. Dabei wurden Antikörper gegen CD10, CD13, CD29, CD31, CD34, CD44, CD49e, CD90w, CD105 und CD146 (alle Fa. BD Biosciences) verwendet.

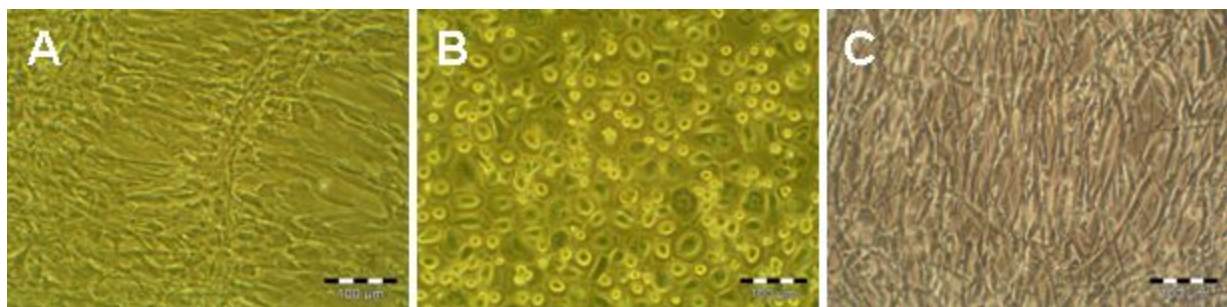


Abbildung 3: (A) Adhärent proliferierende Nabelschnurblutzellen, (B) ausdifferenzierte Neohepatozyten, (C) immortalisierte hepatopankreatische Vorläuferzellen

3.1.2 Aus peripheren Blutmonozyten *in vitro* vordifferenzierte Neohepatozyten

Dieser Zelltyp wurde nach der Methode von Ruhnke et al. (Ruhnke *et al.* 2005c; Ruhnke *et al.* 2005a) aus peripheren Blutmonozyten gewonnen. Ausgangsmaterial waren Buffycoats, die von der Blutbank der Universität Leipzig bezogen wurden. Hierzu wurden die Blutkonserven zunächst mit PBS im Verhältnis 1:1 verdünnt (50mL Volumen aus dem Buffycoat zu 50mL PBS). In 50mL-Falcons wurden jeweils 15mL Ficoll-Trennlösung vorgelegt, der die Buffycoat-Verdünnung vorsichtig überschichtet wurde. Anschließend wurde wie in 3.1.1 beschrieben zentrifugiert, die weiße Interphase mit den mononukleären Zellen abgenommen und durch mehrmaliges Resuspendieren in PBS gewaschen. Nach dem zweiten Waschgang wurden die MNCs gezählt und in 75cm²-Kulturflaschen (Fa. Sarstedt) ausgesät. Die Kultur im Brutschrank erfolgte auch hier in einer Atmosphäre mit 95% Luftfeuchte und 5% CO₂ bei 37°C. Während der ersten sechs Tage ab der Isolation wurden die MNCs mit einem speziellen Dedifferenzierungsmedium auf der Basis von RPMI1640 (ohne Phenolrot; Fa.

Invitrogen) mit Zusatz von 10% humanen Albumin (Fa. Invitrogen), 2mM L-Glutamin (Fa. Invitrogen), 100U/mL Penicillin (Fa. Invitrogen), 0,1mg/mL Streptomycin (Fa. Invitrogen), 140µM β-Mercaptoethanol (Fa. Carl Roth), sowie als Wachstumsfaktoren 5ng/mL M-CSF (M-CSF, *engl. macrophage colony stimulating factor*; Fa. R&D Systems) und 0,4ng/mL IL-3 (IL-3, *engl. InterLeukin-3*; R&D Systems) kultiviert und programmierbaren Zellen dedifferenziert (PCMOs, *engl. programmable cells of monocytic origin*). Im Anschluss an diese Dedifferenzierungsphase wurden die PCMOs für 10d in Differenzierungsmedium kultiviert, einem RPMI1640-Medium, das anstelle von M-CSF und IL-3 3ng/mL FGF-4 (FGF-4, *engl. Fibroblast Growth Factor-4*; Fa. R&D Systems), und anstelle humanen Albumins 10% fetales Kälberserum (Fa. Invitrogen) enthält. Ein Medienwechsel wurde sowohl während der Dedifferenzierungsphase als auch in der Differenzierungsphase alle 2d durchgeführt. Während der Kultivierung mit Differenzierungsmedium nähert sich die Morphologie der Neohepatozyten (Abbildung 3B) immer mehr der von Primärhepatozyten an.

3.1.3 Nestin-positive hepatopankreatische Vorläuferzellen

Diese Vorläuferzellen wurden in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Zulewski an der Universitätsklinik Basel zur Verfügung gestellt. Die Isolation der pankreatischen Insel-Zellen wurde wie von Zulewski et al. (von Mach *et al.* 2004; Zulewski *et al.* 2001) beschrieben durchgeführt. Nach Expression eines EGFP-Reporterkonstrukts mit dem Nestin-Promotor wurden mittels FACS (FACS, *engl. fluorescent activated cell sorting*) EGFP-positive Einzelzellen selektiert und weiterkultiviert. Zur Kultivierung der Zellen wurde RPMI1640 (mit Phenolrot und stabilisiertem L-Glutamin; Fa. Gibco) mit Zusatz von 10% FCS, 100U/mL Penicillin, 0,1mg/mL Streptomycin, 10mM HEPES (Fa. Carl-Roth), 1mM Natriumpyruvat (Fa. Sigma), 50µM β-Mercaptoethanol (Fa. Carl-Roth), sowie 20ng/mL bFGF (bFGF, *engl. basic fibroblast growth factor*, Fa. PAN) und 20ng/mL EGF (EGF, *engl. epidermal growth factor*, Fa. PAN) verwendet. Die Atmosphäre des Inkubators hatte eine Konzentration von 5% CO₂ sowie 95% Luftfeuchtigkeit bei 37°C. Das Zellkulturmedium wurde zwei Mal die Woche ersetzt. Neben einem nicht-immortalisierten hepatopankreatischen Zelltyp (HP) wurde in Basel auch eine Immortalisierung der HP-Zellen durchgeführt. Dazu wurde ein bestimmter Klon (BC11, Abbildung 3C) mittels lentiviraler Vektoren mit hTERT (hTERT, *engl. human telomerase reverse transcriptase*) und mBMI1 immortalisiert (Salmon *et al.* 2000; Eberhardt *et al.* 2006). Zusätzlich wurden die immortalisierten BC11-Zellen mit einem Nestin-GFP-Promotor-Konstrukt transduziert (GFP, *engl. green fluorescent protein*). Über FACS wurden nun GFP-positive Zellen sortiert, so dass eine hochreine Nestin-positive Zellpopulation erhalten wurde (Eberhardt *et al.* 2006). Die so immortalisierten BC11-

Zellen ließen sich bisher über mehr als 80 1:5 Passagen weiterkultivieren. Hingegen waren die nicht-immortalisierten HP-Zellen für nur etwa 10 1:5 Passagen kultivierbar.

3.1.4 Humane Primärhepatozyten

Humane Primärhepatozyten wurden wie von Dorko et al (Dorko *et al.* 1994) beschrieben durch Perfusion humaner Leberresektate erhalten. Die Perfusionen wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Nüssler an der Charité Berlin durchgeführt und die Zellen anschließend per Kurier nach Leipzig transportiert. Wurden die Zellen in Kulturschalen geliefert, wurde das Medium gewechselt. Zur Kultur der humanen Primärhepatozyten wurde das in 3.1.1 beschriebene William's Medium E verwendet. Primäre Leberzellen in Suspension wurden direkt nach Erhalt für den Versuch eingesetzt.

3.2 Zellkultur

3.2.1 Adhärenz proliferierende Nabelschnurblutzellen und hepatopankreatische Zellen

Die Kultur der verschiedenen adhärenz proliferierenden Nabelschnurblutzellen und der hepatopankreatischen Zellen wurde mit denen in 3.1.1 und 3.1.3 beschriebenen Kulturmedien in einem CO₂-Inkubator mit 5% CO₂, 95% Luftfeuchte und 37°C Umgebungstemperatur durchgeführt. Das Zellkulturmedium wurde zwei Mal die Woche durch vorher auf 37°C erwärmtes frisches Medium ersetzt. Wachstumsfaktoren wurden immer erst vor Gebrauch einer neuen Medienflasche zugegeben, um einem vorzeitigen Abbau vorzubeugen. War der Zellrasen in einer 75cm²-Kulturflasche mehr als 80% konfluent, wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:5 passagiert. Dazu wurde wie in 3.1 beschrieben das Medium quantitativ entfernt. Anschließend wurden die Flaschen zwei Mal mit 10mL PBS gespült, um tote Zellen sowie letzte Proteinreste des Mediums herunterzuspülen. Nun wurden in jede Kulturflasche 2mL 0,05% Trypsin / 0,02% EDTA pipettiert und die Kulturgefäße wieder in den Inkubator überführt. In Abhängigkeit des Zelltyps wurden die Zellen nach 5 – 10min aus dem Inkubator genommen und durch sanftes Klopfen auf den Rand der Kulturflasche abgelöst. Anschließend wurde das Trypsin durch Zugabe von 10mL Vollmedium inaktiviert. Die so erhaltene Zellsuspension wurde dann in gleichen Aliquots auf fünf 75cm²-Kulturflaschen überführt. Um Rückstellproben der Zellen für weitere Versuche zu erhalten, wurden bei den Passageschritten Zellen wie in 3.1 beschrieben in Kryovials eingefroren.

3.2.2 Aus peripheren Blutmonozyten *in vitro* vordifferenzierte Hepatozyten-ähnliche Zellen

Anders als die Nabelschnurblutzellen und die hepatopankreatischen Zellen wurde dieser Zelltyp nicht weiterpassagiert, sondern immer bei Bedarf neu aus Buffycoats isoliert. Die Kultur der isolierten und differenzierten Zellen erfolgte wie in 3.1 beschrieben.

3.3 Transplantation der Stamm- und Vorläuferzellen

3.3.1 Versuchstiere

Zur Transplantation wurden immundefiziente männliche und weibliche SCID-Mäuse (SCID, *engl. Severe Combined Immunodeficiency Disease*) im Alter von 10 – 14 Wochen verwendet. Diese wurden von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Um ein noch toleranteres Mausmodell für die Transplantation zu verwenden, wurden weitere Transplantationen an NOD/SCID-Mäusen (NOD/SCID, *engl. Non Obese Diabetic / SCID*) durchgeführt. Zur Verfügung gestellt wurden diese Mäuse vom Medizinisch Experimentellen Zentrum der Universität Leipzig. Neben diesen beiden Modellen wurden auch Transplantationen an uPA/RAG-2-Mäusen (uPA/RAG, *engl. urokinase-type Plasminogen Activator / Recombination Activation Gene 2*) durchgeführt. Diese Mäuse wurden uns von Dr. Petersen, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, zur Verfügung gestellt. Die Tiere wurden mit Standard-Pellets (Fa. Sniff) gefüttert und hatten freien Zugang zu Trinkwasser. Bis zum Tag der Operation wurden die Tiere unter SPF-Bedingungen (SPF, *engl. specific pathogen free*) gehalten. In der Zeit von Transplantation bis zur Explantation wurden die Tiere in einem abgetrennten klimatisierten Tierstall mit künstlichem Tag-/Nachtwechsel gehalten. Für die Tierexperimente lag eine Tierversuchsgenehmigung vor.

3.3.2 Vorbereitung der Zellen zur Transplantation

3.3.2.1 Adhärenz proliferierende Nabelschnurblutzellen und hepatopankreatische Zellen

Unmittelbar vor der Transplantation wurden die Zellen geerntet, je nach Versuch markiert und in einem definierten Volumen resuspendiert. Die Nabelschnurblutzellen sowie die hepatopankreatischen Zellen wurden wie in 3.2 beschrieben abtrypsinisiert. Dabei wurden die Zellsuspensionen verschiedener Flaschen der gleichen Passage vereint und für 10min bei 400g und RT herunterzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und das Zellpellet in einem geringen Volumen an Kulturmedium resuspendiert und gezählt. Für die Transplantation

wurde die Zellsuspension auf eine Konzentration von 750.000 Zellen pro 100 μ L Medium eingestellt.

3.3.2.2 Aus peripheren Blutmonozyten *in vitro* vordifferenzierte Neohepatozyten

Um diesen Zelltyp durch Trypsin aus der Kulturschale zu lösen, wurde zunächst das Kulturmedium wie beschrieben quantitativ entfernt und die Flaschen wurden anschließend zwei Mal mit PBS gespült. Zum Ablösen der Neohepatozyten wurde pro Kulturflasche 5mL 10fach konzentrierten Trypsins (Fa. PAA) gegeben. Weil sich diese Zellen nur sehr schwer von der Platte ablösen, wurde die Inkubation der Zellen mit Trypsin für 1h bei 37°C im Inkubator durchgeführt. Im Anschluss daran wurde das Trypsin durch Zugabe von 10mL Vollmedium inaktiviert. Die so erhaltene Suspension wurde 10min bei 400g bei RT herunterzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in wenig Medium resuspendiert. Auch hier wurden die Zellen auf eine Konzentration von 750.000 Zellen pro 100 μ L Medium eingestellt.

3.3.2.3 Humane Primärhepatozyten

Wurde dieser Zelltyp in Suspension geliefert, wurden die Transplantationsversuche direkt nach Erhalt durchgeführt. Hierzu wurde die Suspension für 10min bei 400g und RT herunterzentrifugiert, das Pellet in wenig Medium resuspendiert und die Zellen auf eine Konzentration von 750.000 Zellen pro 100 μ L eingestellt.

Adhärenz in kollagenierten 75cm²-Zellkulturflaschen ausgesäte Primärhepatozyten wurden nach Anlieferung über Nacht mit frischem William's Medium E im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Vor dem Transplantationsversuch wurden die Zellen wie bei den adhärenz proliferierenden Nabelschnurblutzellen (3.3.2.1) beschrieben mit Trypsin geerntet und auf eine Konzentration von 750.000 Zellen pro 100 μ L eingestellt. Sowohl bei den Suspensions- als auch bei den adhärenz humanen Leberzellen wurde die Vitalität der Zellen mittels Trypanblau-Ausschluss bestimmt. Dazu wurde nach der Ernte, bzw. direkt aus der Suspension, ein Volumen von 20 μ L entnommen und mit einem gleichen Teil an Trypanblau vermischt und die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop gezählt. Tote Zellen färben sich hierbei blau, da sie nicht mehr in der Lage sind, Trypanblau aktiv auszuschließen. Markierung der Zellen vor der Transplantation

3.3.2.4 CM-DiI

Für einige Experimente erfolgte eine *in vitro* Markierung der Zellen vor der Transplantation. Die Markierung der Zellen wurde durchgeführt, bevor die Zellen auf die finale

Transplantationskonzentration eingestellt wurden. Zum Markieren der Zellen wurde CM-DiI (Fa. Molecular Probes), ein fluoreszierender Membranfarbstoff, verwendet, der mit einem Fluoreszenzfilter für Cy3 detektiert werden kann. Entsprechend der Angabe des Herstellers wurde die Stammlösung mit einer Konzentration von 1mg/mL in DMSO angesetzt und bei -20°C gelagert. Zum Anfärben wurde die Stammlösung mit Vollmedium bis zu einer Endkonzentration von 10µg/mL verdünnt. Pro mL Färbelösung dieser Konzentration wurden 1×10^6 Zellen angefärbt. Dazu wurden entsprechend den Angaben des Datenblatts die Zellen im Färbemedium resuspendiert und darin für 30min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Um ein Sedimentieren der Zellen zu vermeiden, wurden die Zellen alle 5min durch sanftes Schwenken wieder in Suspension gebracht. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Zellen für 10min bei 400g und RT herunterzentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde noch ein zweites Mal wiederholt. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet in soviel Medium aufgenommen, dass pro 100µL 750.000 Zellen suspendiert waren.

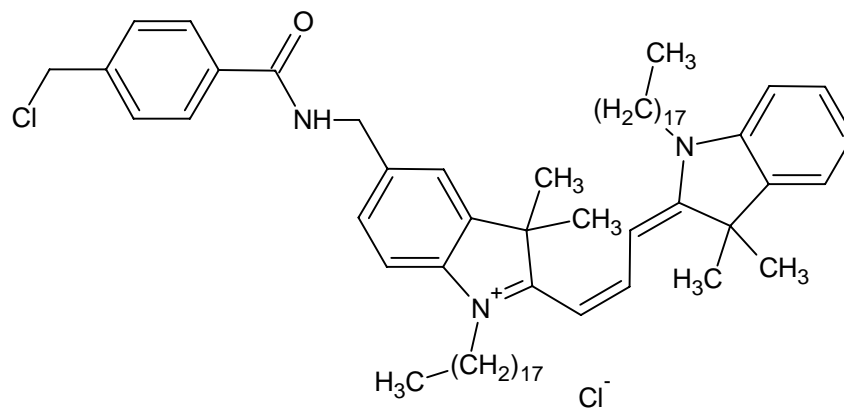


Abbildung 4: Strukturformel des Membran-Fluoreszenzfarbstoffes CM-DiI

3.3.2.5 Qdot655-Nanopartikel

Als Alternative zum Membranfarbstoff CM-DiI wurde eine *in vitro* Markierung der Zellen mit Qdot655-Nanopartikeln (Fa. Molecular Probes) durchgeführt. Vor der Färbung wurden die zu markierenden Zellen geerntet, gezählt und entsprechend der fürs Experiment benötigten Anzahl verdünnt. Die Lösung zum Markieren der Zellen wurde entsprechend den Angaben der Packungsbeilage angesetzt. Zum Färben von 1×10^6 Zellen wurde eine 10nM Lösung aus 1µL Lösung A und 1µL Lösung B des Qdot-Kits verwendet. Beide Komponenten wurden in einem 1,5mL Eppendorf-Gefäß mithilfe einer Pipette vermischt. Zu diesem Ansatz wurden 200µL Zellkulturmedium pipettiert und die Lösung einige Sekunden gevortext. Unmittelbar vor der Markierung mit den Nanopartikeln wurden die in Suspension befindlichen Zellen 10min bei 400g herunterzentrifugiert und der Mediumüberstand dekantiert. Das zu-

rückgebliebene Pellet wurde nun in der zuvor angesetzten Färbelösung resuspendiert und die Suspension für 30min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Um ein Sedimentieren der Zellen zu verhindern, wurde die Zellsuspension mehrfach während der Inkubation gewendet. Im Anschluss an die Inkubation wurde wie in 3.3.2.4 beschrieben weiter verfahren.

3.3.3 Transplantation der Zellen ins Leberparenchym

Nach dem Ernten und Aufnehmen der Zellen im Transplantationsvolumen (entsprechend 750.000 Zellen pro 100µL Medium) wurden sie bis zur Transplantation auf Eis gestellt und erst direkt vor der Beginn der Operation in eine Insulinspritze (Fa. BD Plastipak) mit einer 26 Gauge-Kanüle (0,45x13mm, Fa. BD Microlance) aufgezogen. Unmittelbar vor der Transplantation wurden die Versuchstiere mit einer intraperitonealen (i.p.) Injektion von 61,5mg/kg Ketamin (Fa. Ratiopharm) und 2,3mg/kg Xylazin (Handelsname Rompun, Fa. Bayer) anästhesiert. Das Narkosemittel wurde jeweils vor Gebrauch durch Verdünnung in physiologischer Kochsalzlösung frisch angesetzt. Die Tiefe der Narkose wurde durch leichtes Anblasen der Mäuse in Kopfhöhe sowie Kneifen des Schwanzes sichergestellt. Die narkotisierte Maus wurde auf einem passenden Gestell mit Klebestreifen fixiert und anschließend rasiert (Abbildung 5A). Zur Desinfektion wurde der freirasierte Teil mit 70%igem Ethanol abgesprüht. Um die Leber frei zu präparieren, wurde mithilfe eines Skalpell (Fa. Braun) ein Schnitt auf der Höhe des Sternums (Brustbein) durchgeführt. Hierbei wurde zunächst die obere Hautschicht in einem Zug durchtrennt und dann das darunter liegende Gewebe. Mit einer Kompresse wurde der linke Leberlappen der Maus durch leichtes Drücken auf den Bauch und gleichzeitiges Verschieben der Kompresse freigelegt (Abbildung 5B). Die zuvor aufgezogene Zellsuspension wurde nun langsam in einem Zeitraum von 30 – 60s in das Leberparenchym des linken Leberlappens injiziert (Abbildung 5C), wobei sich das Parenchym entfärbte. Durch die angewandte Freilegungstechnik wurde sichergestellt, dass die Injektionen stets in den gleichen Leberlappen durchgeführt wurden. Unter Zuhilfenahme von zwei Pinzetten wurde die freigelegte Leber nun berührungsfrei durch leichtes Anheben der Bauchmuskulatur der Maus wieder zurück in die Bauchhöhle überführt. Mit chirurgischem Nahtmaterial (Fa. Ethicon) wurde nun zuerst die Bauchdecke und dann die Hautschicht mit einer fortlaufenden Naht verschlossen (Abbildung 5D). Anschließend wurden die Mäuse bis zum Aufwachen in einem Käfig unter Rotlicht gewärmt. Gegen das Austrocknen der Augen wurde vorsichtig physiologische Kochsalzlösung auf die Augen getropft. Bis zur Explantation wurden die Mäuse in einen gesonderten Tierstall gebracht.

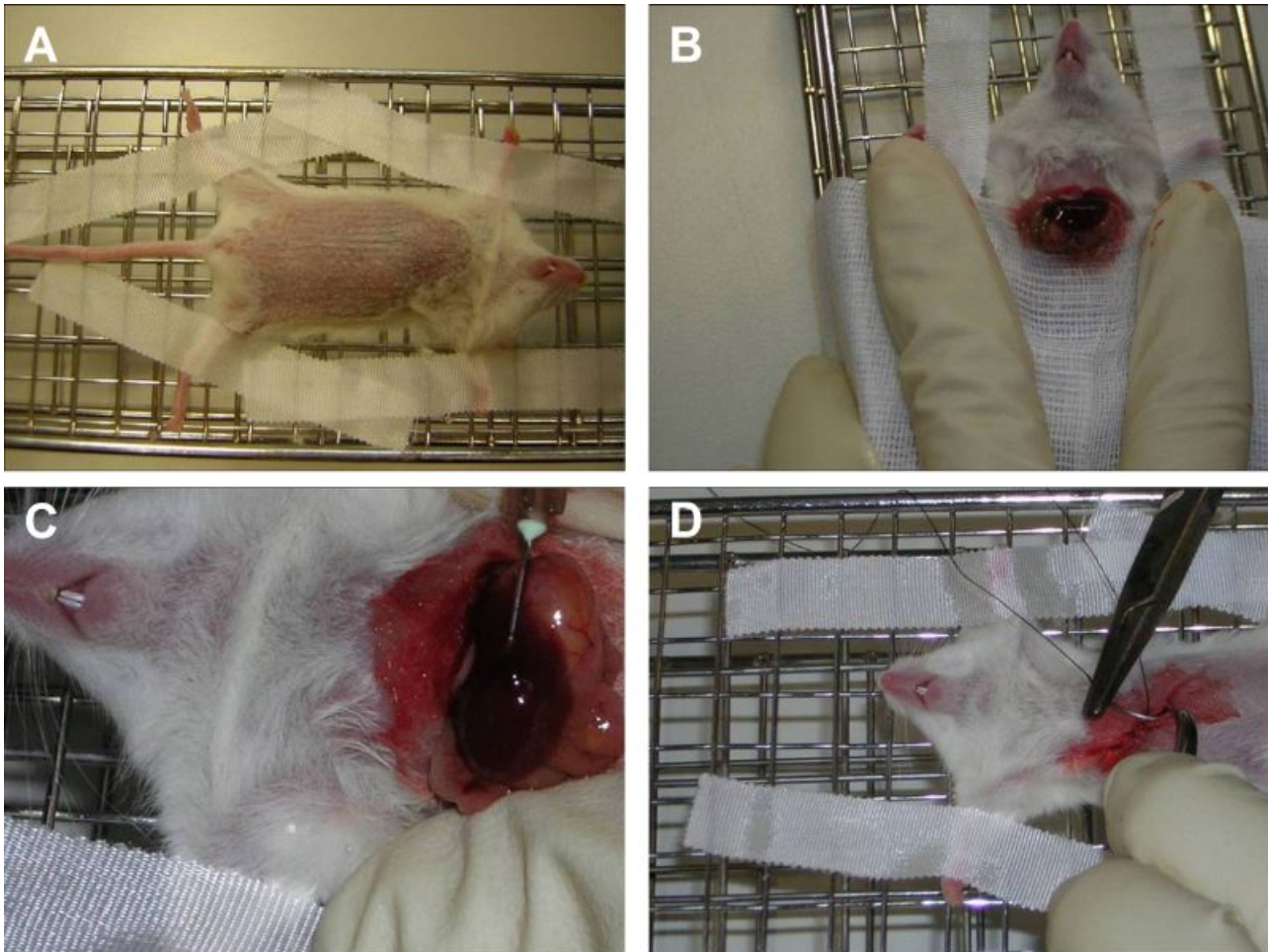


Abbildung 5: Transplantation von Stammzellen durch direkte Injektion in das Parenchym des linken Leberlappens einer NOD/SCID-Maus. (A) Fixierte Maus auf Gestell, (B) Maus unterhalb des Sternums geöffnet, (C) Injektion von Zellen direkt ins Parenchym, (D) Zunähen der Mäuse nach der Transplantation

3.3.4 Transplantation der Zellen in die Leber via Milz

Neben mit der im vorangehenden Abschnitt beschriebenen Technik wurden in einer Versuchsreihe auch Zellen via Milz in die Lebern von uPA/RAG-2-Mäusen injiziert. Die Aufbereitung der Zellen wurde analog 3.3.3 durchgeführt. Narkotisiert wurden die Mäuse mittels Diethylether (Fa. Carl-Roth). Mit einem ca. 0,5cm langen Schnitt ca. 1cm links unterhalb des Brustbeins wurde die Milz vorsichtig freigelegt und mit einem sterilen Faden eine Ligatur um das Organ gelegt. Die Zellsuspension wurde mit einer Kanüle durch den abgeschnürten Teil der Milz langsam injiziert, so dass die Suspension über die *vena portae* (Pfortader) in die Leber abfließen kann. Mit chirurgischem Nahtmaterial wurde zunächst die Bauchsicht und dann die Haut wie in 3.3.3 beschrieben zugenäht. Bis zum Aufwachen wurden die Mäuse unter Rotlicht gewärmt.

3.4 Explantation der transplantierten Lebern

Sofern nicht anders angegeben, erfolgte die Explantation der transplantierten Gewebe nach 21d. Hierzu wurden die Mäuse mittels Genickbruch getötet. Anschließend wurde die

Bauchhöhle schnellstmöglich mit einer Schere geöffnet und der injizierte Leberlappen mithilfe einer Pinzette an einer Stelle gefasst und ohne mit der Pinzette nachzugreifen freigelegt. Der Lappen wurde nun möglichst quantitativ vom Leberstamm her mit einer Schere abgetrennt und auf einem Stück Papier mit einem Skalpell in zwei Stücke geteilt. Ein größeres Stück (1,5x0,4x1cm) wurde für immunhistochemische Untersuchungen in 4%igem gepuffertem Formalin (Uniklinik-Apotheke) fixiert, ein kleineres Stück (1mm³) für PCR-Untersuchungen (PCR, *engl. polymerase chain reaction*) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Die Formalinfixierung wurde für 5 – 7d bei RT durchgeführt. Um das Fixans auszuwaschen, wurden die Proben für 48h in PBS gewaschen. Die Einbettung der Präparate in Paraffin sowie die Anfertigung der Schnitte wurde im Rechtsmedizinischen Institut der Universität Leipzig durchgeführt. Dazu wurden die Proben für jeweils 45min je zwei Mal in 70%, 90% und 95% Ethanol sowie drei Mal in 100% Ethanol entwässert. Anschließend wurden die Gewebe für vier Mal zehn Minuten in Xylol (Fa. Carl-Roth) getaucht und dann über Nacht bei 60°C in ein Xylol-/Paraffin-Gemisch (1:1) gegeben. Danach wurden die Gewebe zwei Mal für 3h in 60°C warmen Paraffin eingelegt, woraufhin die Proben dann in Paraffin mithilfe einer Einbettapparatur (Fa. Bavimed) eingebettet wurden. Von den so erhaltenen Paraffinblöcken wurden nun 5µm dicke Schnitte an einem Mikrotom (Fa. Micron) angefertigt und auf beschichtete SuperfrostPlus Objektträger (Fa. Menzel) aufgezogen.

Bei Durchführung der oben genannten Immersionsfixierung kommt es zwangsläufig zu einem Mitfixieren der Erythrozyten. Da diese die Interpretation immunhistochemischer Ergebnisse insbesondere bei Fluoreszenztechniken erschweren, wurden spätere Proben vor der Immersionsfixierung mit PBS und 4%igem gepufferten Formalin perfundiert. Dazu wurden den Mäusen, um eine Gerinnung des Blutes zu vermeiden, 100 Einheiten Heparin (Fa. Ratiopharm) i.p. injiziert. Zudem wurde den Mäusen eine letale Dosis von 60mg/kg Körpergewicht (KG) Pentobarbital (Apotheke, Uniklinik Leipzig) i.p. verabreicht. Nachdem die Mäuse eingeschlafen waren, das Herz aber noch am Schlagen war, wurden sie wie für die Transplantation auf einem Gestell mit Klebeband fixiert. Mit einer Schere wurde die Bauchhöhle geöffnet und der Darm beiseite geschoben, so dass der Zugang zur *vena cava* frei war. Mit einer Pinzette wurde nun vorsichtig, ohne das Gefäß zu verletzen, ein Faden unter der Vene hindurch gezogen. Anschließend wurde die Vene mit einer Schere angeschnitten, und eine an einer peristaltischen Pumpe (Fa. Desaga) über einen flexiblen Schlauch befestigte Kanüle vorsichtig in die Vene eingeführt und mit dem Faden das Gefäß umschlossen. Durch die Pumpe wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 10mL/min auf 37°C vorgewärmtes PBS in die Leber gespült. Begann sich die Leber zu blähen und die Läppchenstruktur sichtbar zu

werden, wurde ein Entlastungsschnitt an der Pfortader (*vena portae*) durchgeführt, so dass die Leber vollständig entfärbt wurde, erkennbar an der beigen Farbe. Im Anschluss an das fünfminütige Spülen mit PBS wurde ein kleines Stück des entfärbten und blutleeren injizierten Lappens mit einer Schere abgetrennt und in flüssigen Stickstoff für PCR-Untersuchungen eingefroren. Währenddessen wurde die Pumpe gestoppt und das verbliebene PBS fast vollständig abgelassen, bis nur noch ein geringer Rest im Schlauch war. Anschließend wurde 4%ige gepufferte Formalinlösung in das Vorratsgefäß überführt, kontrolliert, ob das System blasenfrei ist, und dann erneut für fünf Minuten bei einem Fluss von 10mL/min perfundiert. Nach Ablauf der fünf Minuten wurde die nun gummiartig feste Leber am Stumpf entnommen und der injizierte Leberlappen durch Einlegen in 4%igem gepufferte Formalin-Lösung immersionsfixiert. Die Dauer der Fixierung, der Wechsel auf PBS, die Einbettung in Paraffin sowie das Anfertigen der Schnitte erfolgte wie oben beschrieben.

3.5 Fixierung humaner Lebern

Humane Gewebestücke wurden aus bei -80°C tiefgefrorenen Resektaten verschiedener Patienten erhalten. Dazu wurde ein Stück mithilfe eines Skalpells vorsichtig vom tiefgefrorenen Präparat abgetrennt und in 4%igem gepuffertem Formalin aufgetaut. Die anschließenden Schritte wurden wie in 3.4 beschrieben durchgeführt.

3.6 Immunhistochemie zur Detektion humanen Albumins

Mithilfe der Immunhistochemie wurde die Expression humanen Albumins als Beispiel eines leberspezifischen Markers in den transplantierten Stamm- und Vorläuferzellen untersucht. Dabei kam ein spezifisch gegen humanes Albumin (huAlb) gerichteter Antikörper zum Einsatz. Die Detektion erfolgte mit zwei verschiedenen Systemen. Zum einen wurde die so genannte ABC-Methode mit DAB als Substrat verwendet, zum anderen kam eine indirekte Fluoreszenzmethode mit Fluoreszenz-markiertem Zweitantikörper zum Einsatz. Die Immunhistochemie wurde auf 5µm dicken Gewebeschnitten, die auf Superfrost-Plus-Objektträgern aufgezogen waren, durchgeführt. In jedem Färbegang wurden zur methodischen Kontrolle sowohl ein Schnitt einer humanen Leber als Positivkontrolle als auch ein Schnitt einer nicht-transplantierten oder scheintransplantierten NOD/SCID-Maus als Negativkontrolle mitgeführt. Das Protokoll der Immunhistochemie wurde ausgehend vom Handbuch für immunhistochemische Färbungen (Boehnisch *et al.* 2003) entwickelt.

3.6.1 Entparaffinisierung und Demaskierung der Antigene

Durch viermaliges Waschen á fünf Minuten in Rotihistol (Xylol-Ersatz, Fa. Carl-Roth) wurden die Paraffinschnitte zunächst entparaffinisiert. Anschließend wurden die Schnitte in einem absteigenden Ethanol-Gradienten (von 100% Ethanol über 95%, 90% bis 70% für jeweils fünf Minuten) hydriert. Für weitere fünf Minuten wurden die Schnitte in TBS-Puffer (TBS, *engl. tris buffered saline*) gewaschen und anschließend in den Citrat-Aufschlusspuffer überführt. Die Demaskierung der Antigene wurde mittels eines Mikrowellenaufschlusses durchgeführt. Dazu wurden die Proben für zwei Mal sieben Minuten bei maximaler Leistung der Mikrowelle im Citrat-Puffer bis zum Sieden erhitzt. Nach den ersten sieben Minuten wurde verdunsteter Puffer mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Im Anschluss an den Aufschluss kühlten die Proben für fünfzehn Minuten bei Raumtemperatur, dem weitere fünf Minuten im Wasserbad folgten. Da die nun entparaffinisierten und demaskierten Schnitte sehr leicht austrocknen können, wurde darauf geachtet, dass die Gewebeschnitte stets mit Flüssigkeit bedeckt waren.

3.6.2 Blocken unspezifischer Reaktionen und Bindungsstellen

Endogene Peroxidase im Lebergewebe wurde mithilfe von 7,5%iger H_2O_2 -Lösung in absolutem Methanol für 30min bei Raumtemperatur geblockt. Im Anschluss wurden die Schnitte für drei Mal fünf Minuten in TBS-Puffer gewaschen. Ab diesem Schritt wurden alle weiteren Schritte in einer Feuchtekammer durchgeführt, um ein Austrocknen der Schnitte zu vermeiden. Um Reagenzien zu sparen, wurden die Schnitte mit einem hydrophoben Fettstift (DakoCytomationPen, Fa. Dako) eingekreist. Unspezifische Bindungsstellen für den Antikörper wurden mit 3%igem Rinderserumalbumin (BSA, *engl. bovine serum albumin*) in TBS-Puffer für 90min bei RT geblockt. Pro Schnitt wurden ca. 100µL an Blocking-Reagenz eingeplant. Diesem Schritt folgte kein Waschgang. Um endogenes Biotin und Avidin zu blocken wurde ein kommerzielles Avidin-/Biotin-Blocking-Kit (Fa. Vectorlabs) verwendet. Zuerst wurde die gebrauchsfertige Avidin-Blocking-Lösung für 15min auf den Schnitten bei RT inkubiert, danach wurden die Schnitte vorsichtig abgeklopft, um die Lösung möglichst quantitativ vom Schnitt zu entfernen. Dem folgte 15min Inkubation mit der Biotin-Blocking-Lösung aus dem Kit. Anschließend erfolgte kein Waschgang mit TBS-Puffer, erneut wurde vor dem Pipettieren des Erstantikörpers der Objektträger durch vorsichtiges Klopfen von Flüssigkeit befreit.

3.6.3 Inkubation mit Erstantikörper spezifisch gegen humanes Albumin

Der Erstantikörper (α -humanes Albumin; aus Kaninchen, Fa. Abcam) wurde je nach Methode in zwei unterschiedlichen Konzentrationen angewendet. Zum Verdünnen des Erstantikörpers wurde 0,3% BSA in TBS-Puffer verwendet. In der ABC-Methode wurde der Antikörper 1:1000 verdünnt eingesetzt, bei Verwendung der indirekten Fluoreszenz-Methode war eine 1:500-Verdünnung notwendig. Inkubiert wurde in beiden Fällen für 1h bei RT. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Schnitte drei Mal für je fünf Minuten in TBS-Puffer gewaschen. Die Detektion des Erstantikörpers wurde auf zwei verschiedene im Folgenden beschriebenen Methoden durchgeführt, der ABC-Methode (vgl. 3.6.4) sowie der indirekten Fluoreszenzmethode (vgl. 3.6.5).

3.6.4 ABC-Methode

Bei der ABC-Methode (ABC, *engl. Avidin Biotin Complex*) wird der Erstantikörper über einen biotinylierten Zweitantikörper sowie Streptavidin, welches mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist, detektiert. Dabei wird ausgenutzt, dass Streptavidin und Biotin in einem beinahe quantitativen Verhältnis von 1:4 aneinander binden. Durch die Meerrettich-Peroxidase wird zugegebenes Diaminobenzidin (DAB, Fa. Dako) umgesetzt, so dass ein braunes Präzipitat entsteht. Zur Durchführung der ABC-Methode wurde ein kommerzielles Zweitantikörperkit (Fa. Vectorlabs) verwendet. Hierin enthalten ist ein Zweitantikörper (α -Kaninchen; aus Ziege), Blocking-Serum (aus Ziege) und das ABC-Reagenz (zwei Komponenten).

3.6.4.1 Inkubation mit Zweitantikörper

Der Zweitantikörper wurde dem Datenblatt des Kits entsprechend angesetzt. Hierzu wurden 2mL TBS in einem 15mL-Falcon vorgelegt, wozu 30 μ L an Blocking-Serum aus dem Kit pipettiert wurden. Zu diesem Ansatz wurden noch 10 μ L Zweitantikörper unverdünnt gegeben. Nach anschließendem Vortexen wurden die Schnitte mit Zweitantikörper für 30min bei RT in der Feuchtekammer inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Objektträger drei Mal je fünf Minuten in TBS-Puffer gewaschen.

3.6.4.2 Inkubation mit ABC-Reagenz

Hierbei wurde wie vom Hersteller vorgegeben eine 1:20 Verdünnung der Gebrauchslösungen in TBS-Puffer hergestellt. Vor Gebrauch muss diese Lösung für 30min bei RT inkubieren. Im Anschluss an den letzten Waschgang der Zweitantikörper-Inkubation wurde das vorinkubierte ABC-Reagenz auf die Gewebeschnitte pipettiert und für 30min bei RT in der

Feuchtekammer inkubiert. Daran anschließend wurden die Objektträger vorsichtig abgeklopft und drei Mal für jeweils fünf Minuten in TBS-Puffer gewaschen.

3.6.4.3 Inkubation mit Diaminobenzidin (DAB)

Diaminobenzidin wurde entsprechend der Herstellerangabe (Dako) unmittelbar vor der Substratzugabe angesetzt. Pro mL im Kit enthaltener Pufferlösung wurde jeweils ein Tropfen DAB-Lösung (ca. 20µL) direkt aus der Dosierflasche des Nachweiskits zugegeben. Vor dem Zupipettieren wurde dieser Ansatz gevortext, um eine optimale Durchmischung von Reaktionspuffer und DAB zu gewährleisten. Direkt an den letzten Waschgang anschließend wurde frisch zubereitete DAB-Lösung auf die Schnitte pipettiert und für fünf Minuten bei RT in der Feuchtekammer inkubiert. Um ein gleichmäßiges Färbeergebnis zu erhalten, ist hierbei besonders auf genaue Inkubationszeiten acht zu geben. Nach Ablauf der fünf Minuten wurden die Objektträger schnell abgeklopft und für 10min in fließendem Wasser gespült.

3.6.4.4 Gegenfärbung mit Mayers Hämalalaun

Zur Darstellung der Zellkerne wurden die Gewebeschnitte im Anschluss an die Immunhistochemie noch mit Mayers Hämalalaun (Fa. Merck) gegengefärbt. Dazu wurde die 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnte Gebrauchslösung zunächst durch einen Faltenfilter filtriert. Gefärbt wurde für 90s, während dessen die Schnitte mehrmals in der Färbeküvette geschwenkt wurden. Nach der Färbung wurde wieder für 10min mit kaltem fließendem Wasser nachgespült.

3.6.5 Indirekte Fluoreszenz-Methode

Bei Verwendung der indirekten Fluoreszenz-Methode wurde ein Zweitantikörper (α -Kaninchen; aus Esel, Fa. Dianova) verwendet, der direkt mit einem Fluorochrom (Carbocyanin 3, Cy3) markiert ist. Ein Peroxidaseblock sowie der Block gegen endogenes Avidin und Biotin sind bei dieser Methode nicht notwendig.

3.6.5.1 Inkubation mit direktmarkiertem Zweitantikörper

Zur Verdünnung wurde 0,3% BSA in TBS verwendet. Die Konzentration des Zweitantikörpers betrug 1:200, bezogen auf die Stammlösung, die dem Datenblatt entsprechend in destilliertem Wasser angesetzt wurde. Da die Fluorochrome lichtempfindlich sind, wurde direkte Lichteinstrahlung vermieden und die anschließenden Schritte wurden in abgedunkelten Gefäßen durchgeführt. Nach dem letzten Waschschrift der Erstantikörper-Inkubation wurde der Zweitantikörper auf die Gewebeschnitte pipettiert und für 60min bei RT in der Feuchte-

kammer inkubiert. Dem folgend wurde zwei Mal für jeweils fünf Minuten in TBS-Puffer und dann für weitere fünf Minuten in destilliertem Wasser gewaschen.

3.6.5.2 Inkubation mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)

In der indirekten Fluoreszenz-Methode ist die histologische Beurteilung der Zellstrukturen ungleich schwieriger als in lichtmikroskopischen Verfahren. Um die Zellkerne darzustellen, wurde an die Antikörper-Inkubation anschließend eine Kernfärbung mit DAPI (Fa. Molecular Probes) durchgeführt. Hierzu wurde eine Gebrauchslösung mit 2,3 µg/mL in destilliertem Wasser angesetzt und auf die Gewebeschnitte pipettiert. Inkubiert wurde für fünf Minuten in der Feuchtekammer. Im Anschluss daran wurden die Proben für drei Mal fünf Minuten in destilliertem Wasser gewaschen.

3.6.6 Entwässern der Schnitte und Eindecken

Über einen ansteigenden Ethanol-Gradienten (70% bis 100%, jeweils 30s) wurden die Schnitte dehydriert. Anschließend wurden die Objektträger für drei Mal für je ca. 30s in Rotihistol geschwenkt. Nun wurden die Proben mit Entellan (mit Toluol, Fa. Merck) blasenfrei eingedeckt und über Nacht getrocknet.

3.7 Immunhistochemie zur Detektion murinen Albumins

Zur Detektion murinen Albumins (muAlb) in murinem Gewebe wurde ein direkt mit Fluorescein-Isothiocyanin (FITC) markierter Antikörper verwendet (α -murines Albumin aus Ziege, Fa. Bethyl). Entparaffinisierung, Wässerung, Aufschluss der Proben sowie das Blocken unspezifischer Bindungsstellen mit BSA erfolgten wie unter 3.6 beschrieben. Der Antikörper wurde in einer 1:25-Verdünnung für 60min bei RT in der Feuchtekammer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für jeweils fünf Minuten in TBS-Puffer schloss sich eine Kernfärbung mit DAPI an. Entwässerung und Eindecken in Entellan erfolgten wie in 3.6.6 beschrieben.

3.8 Immunhistochemie mit Antikörpern gegen huAlb und muAlb

Um murines und humanes Albumin zusammen in einem Gewebeschnitt nachweisen zu können, wurde die indirekte Fluoreszenz-Methode zur Detektion humanen Albumins mit der Immunhistochemie gegen murines Albumin kombiniert. Alle vorbereitenden Schritte bis zur Erstantikörper-Inkubation erfolgten wie in 3.6 beschrieben. Beide Antikörper wurden in einem Ansatz in den genannten Konzentrationen (huAlb = 1:500 und muAlb = 1:25) eingesetzt. Die Inkubation erfolgte auch hier für 60min bei RT in der Feuchtekammer. An die Im-

munhistochemie anschließend wurde noch eine Kernfärbung mit DAPI durchgeführt. Entwässert und eingedeckt wurden die Schnitte wie in 3.6.6 beschrieben.

3.9 *In situ* Hybridisierung

Um den humanen Ursprung der transplantierten Zellen zu bestätigen, wurden einige transplantierte Gewebe mittels *in situ* Hybridisierung (ISH) untersucht. Humane DNA wurde über eine kommerzielle Sonde gegen *Alu*-Sequenzen (FITC-markiert; Fa. Biogenex) nachgewiesen. Murine Nuklei wurde mithilfe einer Sonde gegen Mouse-major-Satellite-DNA (Abbildung 6; Digoxigenin konjugiert; zur Verfügung gestellt von Prof. Brüstle, Universität Bonn) detektiert. Als Kontrollen dienten auch hier Paraffinschnitte humaner Lebern sowie Paraffinschnitte von Lebern scheintransplantierte oder nicht-transplantierte NOD/SCID-Mäuse. Entparaffinisierung, Hydrierung, sowie Demaskierung der Schnitte mittels Citrat-Auflösungspuffer wurde wie im Kapitel Immunhistochemie beschrieben durchgeführt. Nach dem Abkühlen der Proben wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe von 30% Ethanol über 50%, 70%, 90% und 95% Ethanol für jeweils 1min äquilibriert. Danach anschließend wurden die Proben für 30min auf Filterpapier luftgetrocknet. Die Durchführung der *in situ* Hybridisierung wurde ausgehend von Brüstle et al. (Brüstle et al. 1995; Brüstle et al. 1997) optimiert.

GGACCCGGAACACGGGAGAAAACCGAAAACCGGAAAACGAGAAACACACACCCAGGACGCGAAACACGGGAGGAAAA CCGAAAAAGGCGGAAAACCCAGAAACGCCCACCGCAGGACGCGGAACACGGCAAGAAAACCGAAAACCGGAAAACGAG AAACACCCACCCGACGACCCGAAAACGACGAAACCACCAAAAAACGCGAAAACGAGAAACGCACACCGAA

Abbildung 6: Nukleotid-Sequenz der Mouse-Major-Satellite-DNA (Horz & Altenburger 1981)

3.9.1 Denaturierung und Hybridisierung

30min vor Gebrauch wurde die *Alu*-Sonde aus dem Kühlschrank entnommen und bei RT gelagert. Währenddessen wurde die Mouse-major-Satellite-Sonde langsam auf Eis aufgetaut. Beide Sonden wurden in einem Ansatz zupipettiert. Dazu wurde die Maussonde im Verhältnis 1:50 mit der *Alu*-Sonde verdünnt. Pro zu untersuchendem Schnitt wurden 15-20µL an Sonden-Mix luftblasenfrei pipettiert, anschließend wurde ein Deckglas passender Größe auf die Flüssigkeit gelegt und mit einem Spezialkleber (Fixogum, Fa. Marabu) versiegelt. Nach dem Einsetzen der Feuchtigkeitsstreifen in den Hybridizer (Fa. Dako) wurden die Proben zunächst für 10min bei 95°C denaturiert und anschließend für 16h30min bei 30°C hybridisiert.

3.9.2 Stringentes Waschen

Nach Ablauf der Hybridisierung wurden die Deckgläschen nach Ablösen des Klebers vorsichtig abgenommen und die Proben in 2xSSC/0,1%SDS-Puffer (SSC, *engl. sodiumchloride sodium citrate*; SDS, *engl. sodium dodecyl sulfate*) für zwei Mal 5min bei RT gewaschen. Darauf folgend wurde für 10min in 44°C warmen 0,1xSSC-Puffer für 10min gewaschen, daran anschließend wieder zwei Mal für fünf Minuten in 2xSSC/0,1%SDS-Puffer.

3.9.3 Blocken unspezifischer Bindungsstellen

An das Waschen anschließend wurden die Schnitte vorsichtig durch Abklopfen von Flüssigkeit befreit und mit einem Fettstift großzügig umkreist. Um für die Antikörper unspezifische Bindungsstellen sowie endogenes Avidin und Biotin zu blockieren, wurden die im Kapitel Immunhistochemie beschriebenen Blocks durchgeführt. Allerdings wurde die 3%ige BSA-Lösung hierbei in PBS mit einem Zusatz von 0,1% Tween20 angesetzt.

3.9.4 Detektion der Sonden

Anders als in der kombinierten Immunhistochemie auf humanes und murines Albumin wurden die Sonden nacheinander detektiert. Zum Verdünnen wurde für alle Antikörper 0,3% BSA in PBS mit Zusatz von 0,1% Tween20 verwendet. Zur Detektion der *Alu*-Sonde (FITC-markiert) wurde ein biotinylierter Antikörper gegen Fluorescein in einer 1:100 Verdünnung verwendet (α -Fluorescein; aus Ziege, Fa. Vectorlabs). Die Inkubation erfolgte in einer abgedunkelten Feuchtekammer für 1h bei RT. Im Anschluss daran wurde zwei Mal für jeweils zehn Minuten in PBS gewaschen. Streptavidin-Cy2 (Fa. Dianova) wurde auf den letzten Waschschrift folgend in einer 1:100-Verdünnung für 1h bei RT in der abgedunkelten Feuchtekammer auf den Schnitten inkubiert. Daraufhin wurde wieder zwei Mal für jeweils 10min mit PBS gewaschen. Die Digoxigenin-konjugierte Maussonde wurde über anti-Digoxigenin-Cy3 (Fa. Dianova) in einer 1:500-Verdünnung in einer Inkubation für 1h bei RT in der abgedunkelten Feuchtekammer nachgewiesen. Hieran anschließend wurde zwei Mal für jeweils 10min mit PBS gewaschen. Eine Kernfärbung mit DAPI wurde wie im Kapitel Immunhistochemie beschrieben der Detektion folgend durchgeführt.

3.9.5 Eindecken der Proben

Nach der Kernfärbung mittels DAPI wurden die Objektträger für 10min in PBS und dann 5min in destilliertem Wasser gewaschen. Zum Eindecken der Schnitte wurde ein wässriges Eindeckmedium auf Basis von Mowiol (Fa. Sigma-Aldrich) verwendet. Zur besseren Ap-

plikation wurde das Mowiol vor Verwendung im Heizblock auf maximal 50°C angewärmt, auf die Schnitte pipettiert, blasenfrei eingedeckt und über Nacht getrocknet.

3.10 *In situ* Hybridisierung und Immunhistochemie kombiniert

Um die genetische Herkunft human Albumin-positiver Zellen bestimmen zu können, wurde die Technik der *in situ* Hybridisierung mit der Immunhistochemie kombiniert. Ausgewählte Proben wurden dazu zunächst wie beschrieben entparaffinisiert, hydriert und mit Citrat-Aufschlusspuffer demaskiert. Zuerst wurden die Schnitte in der *in situ* Hybridisierung nur mit der *Alu*-Sonde wie in 3.9 beschrieben hybridisiert, danach die Sonde detektiert und eine DAPI-Kernfärbung durchgeführt. Auf diesen Schritt folgend wurden die Objektträger ein Mal für fünf Minuten in destilliertem Wasser und zwei Mal jeweils für fünf Minuten in TBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurde immunhistochemisch die Expression humanen Albumins wie in 3.6 beschrieben mithilfe der ABC-Methode (vgl. 3.6.4) detektiert. Im Anschluss an die Gegenfärbung mit Mayers Hämalaun wurden die Schnitte wässrig mit Mowiol (vgl. 3.9.5) blasenfrei eingedeckt und über Nacht getrocknet.

3.11 Immunhistochemie zur Detektion humaner Hepatozyten

Neben der Immunhistochemie auf die Expression humanen Albumins im murinen Gewebe wurde ein Antikörper spezifisch gegen humane Hepatozyten (HepPar, Clone OCH1E5; Fa. Dako) für die Immunhistochemie etabliert. Die vorbereitenden Schritte bis hin zur Inkubation des Erstantikörpers wurden wie bei der ABC-Methode zur Detektion humanen Albumins durchgeführt. Um den monoklonalen murinen HepPar-Antikörper nach der Erstantikörper-Inkubation detektieren zu können, wurde der Antikörper vor dem Versuch biotinyliert. Hierzu wurde ein spezielles Animal Research Kit (Fa. Dako) verwendet. Die Berechnung der notwendigen Mengen an Reagenzien wurde anhand der Proteinkonzentration des Antikörpers, der Arbeitskonzentration und der für die Analyse benötigten Volumina ausgerechnet (Tabelle 2). Zum Verdünnen wurde TBS mit Zusatz von 0,3% BSA verwendet. Die Biotinylierung des Primärantikörpers wurde am Versuchstag während des Avidin- und Biotinblocks durchgeführt, so dass das Biotinylierungsreagenz mindestens 15min mit dem Erstantikörper reagieren konnte. Die Inkubation des biotinylierten HepPar-Antikörpers wurde für 15min bei RT in der Feuchtekammer durchgeführt. Hierauf folgend wurde drei Mal für je fünf Minuten in TBS gewaschen. Anschließend wurde für 15min mit der im Kit enthaltenen Streptavidin-Peroxidase bei RT in der Feuchtekammer inkubiert, wonach wieder drei Mal für fünf Minuten in TBS gewaschen wurde. Die Entwicklung des DAB, die Gegenfärbung mit

Mayers Hämalaun und das Eindecken der Schnitte wurde wie in bei der Immunhistochemie auf humanes Albumin beschrieben durchgeführt.

Tabelle 2: Biotinylierungsanleitung für den HepPar-Primärantikörper (nach Dako ARKulator)

1. Wie viel Gebrauchslösung wird für n Objektträger benötigt?				
$n \text{ (Anzahl der Objektträger)} \cdot 100\mu\text{L (Volumen pro Objektträger)} = (n \cdot 100)\mu\text{L}$				
2. Wie viel Volumen p an konzentriertem Primärantikörper der Endverdünnung m wird benötigt?				
$\frac{(n \cdot 100)\mu\text{L}}{\frac{1}{m}} = p \mu\text{L}$				
3. Welches Volumen r an Biotinylierungsreagenz wird bei IgG-Konzentration s des Primärantikörpers benötigt?				
$\frac{s \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}}{100 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}} \cdot p \mu\text{L} = r \mu\text{L}$				
4. Welches Volumen u des Blockierungsreagenzes wird benötigt?				
$\frac{(n \cdot 100)\mu\text{L}}{25} = u \mu\text{L}$				
5. Welches Volumen q an Antikörperverdünnungsmedium wird benötigt?				
$(n \cdot 100)\mu\text{L} - (s \mu\text{L} + r \mu\text{L} + u \mu\text{L}) = q \mu\text{L}$				
mit	n	= Anzahl der Objektträger	s	= IgG-Konzentration des Primärantikörpers
	p	= Volumen des konzentrierten Primärantikörpers	u	= Volumen des Blockierungsreagenzes
	m	= Verdünnungsfaktor des Primärantikörpers	q	= Volumen des Verdünnungsmediums
	r	= Volumen des Biotinylierungsreagenzes		

3.12 Histologische Standardfärbungen

3.12.1 Eisennachweis mittels Berliner-Blau-Reaktion

Der Nachweis von Eisen in transplantiertem Gewebe wurde mit der Berliner-Blau-Reaktion durchgeführt. Hierzu wurden die Proben zunächst wie in der Immunhistochemie entparaffinisiert und gewässert. Zur Färbung wurde eine 2%ige Lösung von Kaliumhexacyanoferrat(II) (Apotheke, Uniklinik Leipzig) in 2%iger Salzsäure (HCl; Fa. Carl-Roth) hergestellt, in die die zu untersuchenden Proben für 20min getaucht wurden. Anschließend wurde drei Mal für fünf Minuten in destilliertem Wasser gewaschen. Die Gegenfärbung zur besseren histologischen Beurteilung erfolgte für 5min in Kernechtrot (Apotheke Uniklinik Leipzig), das vor Gebrauch filtriert wurde. Nach zwei abschließenden jeweils fünfminütigen Waschschritten in destilliertem Wasser wurden die Schnitte wie bei Durchführung der Immunhistochemie entwässert und in Entellan eingedeckt.

3.12.2 PAS-Reaktion zum Nachweis von Glykogen

Da die Speicherung von Glykogen auch in Hepatozyten erfolgt, wurden einige Gewebeschnitte nach Entparaffinisierung und Wässerung mit der PAS-Reaktion gefärbt. Hierzu wurden die Schnitte zunächst wie in der Immunhistochemie beschrieben entparaffiniert und hydriert. Nun wurden die Schnitte für 10min in die Oxidationslösung getaucht. Im Anschluss an die Oxidation wurden die Proben für zwei Mal 5min in 70%igem Ethanol gewaschen. Auf diese Waschschriffe folgend wurden die Objektträger für 1min in eine Küvette mit Reduktionslösung gegeben. Zum Waschen wurden die Schnitte für zwei Mal 5min in 70%iges Ethanol getaucht. Darauf folgend wurden die Proben für 15min in Schiff'sches Reagenz gegeben. An diesen Schritt anschließend wurden die Schnitte für 10min unter fließendem Wasser gespült. Die Gegenfärbung der Schnitte mit Hämalalaun und das Eindecken der Objektträger wurde wie im Kapitel 3.6.4.4 beschrieben durchgeführt.

3.13 Mikroskopische Auswertung

Die Beurteilung der immunhistochemischen Färbungen wurde an einem BX41-Mikroskop (Fa. Olympus) mit Fluoreszenzeinrichtung durchgeführt. Im Filterblock dieses Mikroskops waren spezifische Filter für Carbocyanin2 (U-MNI BA-2, Fa. Olympus), Carbocyanin3 (U-MNG2, Fa. Olympus), sowie für DAPI (U-MWU2, Fa. Olympus) eingebaut. Dokumentiert wurden positive Strukturen mittels einer ColorViewII-Kamera (Fa. Soft Imaging System), die Datenerfassung und Archivierung erfolgte über analySIS[^]B (Fa. Soft Imaging System). Einige Proben wurden zusätzlich an einem konfokalen LSM (LSM, *eng. Laser Scanning Microscope*, LSM 510 Meta, Fa. Zeiss) am Paul Flechsig Institut für Hirnforschung der Universität Leipzig durchgeführt.

3.14 PCR-Untersuchungen

3.14.1 Isolierung der DNA aus dem Lebergewebe

Vor Durchführung der Isolation wurden alle verwendeten Gegenstände und der Arbeitsbereich zuvor mittels 70%igem Ethanol und Terralin gereinigt. Die Isolierung der DNA aus dem transplantierten Gewebe wurde mit einem PureGene-Kit (Fa. Genta) durchgeführt. Hierzu wurden die während der Explantation entnommenen und tiefgefrorenen Gewebestücke zunächst zerkleinert. Dazu wurden die Proben in ein Gefäß gefüllt mit flüssigem Stickstoff überführt und dort in eine vorgekühlte sterile Aluminium-Folie gewickelt. Nun wurde die so eingepackte Probe außerhalb des Stickstoffbads mit einem ebenfalls gekühlten Hammer in der Folie zertrümmert. Die noch gefrorenen pulverigen Leberbruchstücke wurden in im Stickstoff

gekühlte 1,5mL Eppendorf-Gefäße überführt. Pro Leber wurden ca. 20 – 30mg an Gewebe pulverisiert, die dann in 900µL Lyse-Puffer (Kit) aufgenommen wurden. Mit einem sterilen Pistill wurden die Gewebestücke homogenisiert und für 15 – 60min bei 65°C inkubiert. Zum Lysat wurden 4,5µL der RNase A Lösung ($c = 4\text{mg/mL}$) aus dem Kit pipettiert. Dieser Ansatz wurde 25 Mal gewendet und dann für 15min bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Probe auf Raumtemperatur abgekühlt. Um die Proteine auszufällen, wurden 300µL der im Kit befindlichen Präzipitationslösung zum Lysat pipettiert und dann für 20s gevortext. Nach 10min Zentrifugation bei 2000g in einer Tischzentrifuge (Fa. Eppendorf) wurde der proteinfreie Überstand abgenommen, das Pellet verworfen. War kein Pellet sichtbar, wurde erneut gevortext und die Proben danach für 5min auf Eis inkubiert und dann erneut zentrifugiert. Zum klaren Überstand wurden 900µL 100%iges Isopropanol (Fa. Carl-Roth) pipettiert und durch mildes ca. fünfzigmaliges Schwenken die DNA ausgefällt. Nach 3min Zentrifugation bei 2000g wurde der Überstand vorsichtig dekantiert und das Pellet in 70%igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurde für 1min bei 2000g zentrifugiert und der Überstand sehr vorsichtig abgegossen um das locker sitzende Pellet nicht zu lösen. Zum Entfernen restlichen Alkohols wurden die Proben über Nacht bei RT getrocknet. Am nächsten Morgen wurde die trockene DNA in 160µL TE-Puffer (TRIS/EDTA-Puffer) aufgenommen und für 60min bei 65°C inkubiert. Von der rehydratisierten DNA wurden für die Konzentrationsbestimmung 10µL abgenommen, das restliche Volumen wurde für PCR-Analysen bei -80°C eingefroren.

Neben DNA aus Lebergewebe wurde auch DNA aus Zellen isoliert. Hierzu wurde zunächst das Kulturmedium quantitativ von den Zellen entfernt. Um letzte Proteinreste zu entfernen, wurden die Zellen vor der Ernte noch zwei Mal mit 10mL PBS gespült. Mithilfe eines Zellschabers wurden der Zellrasen möglichst vollständig aus der Kulturschale geschabt und bei 400g für 5min bei RT herunterzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wie beschrieben in 300µL Lysepuffer aufgenommen. Die weiteren Schritte wurden wie beschrieben durchgeführt.

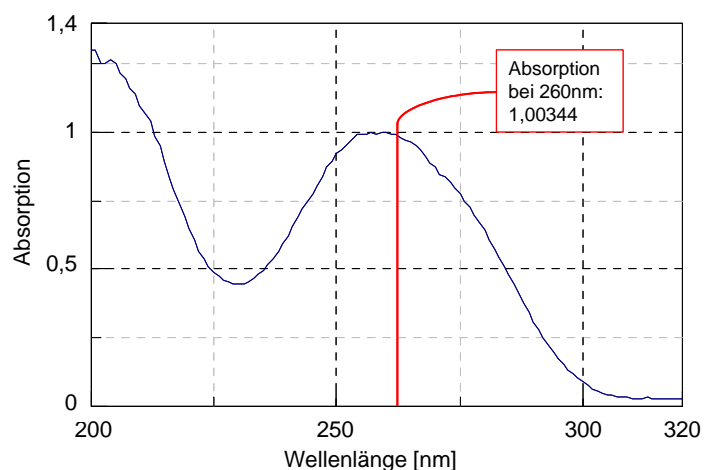


Abbildung 7: Absorptionsspektrum (320nm - 200nm) von Kalbsthymus-DNA in TE-Puffer gelöst

Die Konzentrationsbestimmung der in TE-Puffer gelösten DNA erfolgte fotometrisch bei einer Wellenlänge von 260nm, da bei dieser Wellenlänge in TE-Puffer gelöste DNA ihr Absorptionsmaximum aufweist. Hierzu wurde 50µg/mL Kalbs-thymus-DNA (Fa. Sigma) in TE-Puffer gelöst und die Absorption bei 260nm gemessen (Abbildung 7). Dazu wurde am Fotometer (Fa. Jasco) ein Spektrum von 320nm bis 200nm gefahren. Um mit kleinen Volumina arbeiten zu können, wurde zur Messung eine spezielle Mikro-Quartzküvette (Fa. Hellma) verwendet. Über den 260nm/280nm Quotienten, der bei reiner DNA in TE-Puffer 1,8 beträgt, wurde die Reinheit der DNA bestimmt.

3.14.2 Gelelektrophorese

Zur Gelelektrophorese wurde ein 1%iges Agarose-/Ethidiumbromid-Gel verwendet. Hierzu wurde 3g Agarose (Fa. Carl-Roth) in 150mL TBE-Puffer (Tris Borat EDTA) in einer Mikrowelle mehrfach bis zum Sieden erhitzt. War nach leichtem Schwenken keine Schlierenbildung im Puffer mehr sichtbar, wurde die Lösung 2min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Zur nun nicht mehr siedendheißen Lösung wurden 12µL einer Ethidiumbromid-Lösung (10mg/mL, Fa. Invitrogen, Lagerung im Dunkeln) zupipettiert und durch Schwenken des Gefäßes gleichmäßig verteilt. Dieser Ansatz wurde blasenfrei auf drei Gelkammern verteilt, die jeweils zwei Probenkämme enthielten. Nachdem die Gele abgekühlt und gummiartig fest waren, wurden sie bis zum Gebrauch in Frischhaltefolie eingewickelt bei 4°C gelagert. Die möglichst frischen Gele wurden vor Gebrauch aus dem Kühlschrank entnommen und in die mit TBE-Puffer gefüllte Elektrophorese-Apparatur (Fa. Renner) gelegt, so dass das Gel vollständig von Puffer bedeckt wurde. Anschließend wurden die Kämme vorsichtig entnommen, um ein Kollabieren der Probenaschen zu vermeiden. Als Probenpuffer wurde eine Bromphenolblau-Lösung in Glycerin verwendet. Hiervon wurden pro PCR-Probe 9µL in ein steriles 1,5mL Eppendorfgefäß vorgelegt. In den Puffer wurden jeweils 4µL an PCR-Produkt pipettiert und durch mehrmaliges Heraufziehen mit der Pipette mit dem Auftragspuffer vermischt. Aus diesem Ansatz wurden 10µL pro Probenasche des Gels pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 90Volt für 40 – 45min durchgeführt. Danach wurde das Gel entnommen und mit einem Geldokumentations-System (Fa. Intas) unter UV-Anregung (254nm) mit einer Belichtungszeit von 10 – 25s aufgenommen.

3.14.3 Intron-PCR zur spezifischen Amplifikation humanen Albumins

Um in transplantiertem murinem Gewebe die DNA des humanen Albumingens zu amplifizieren, wurde eine Intron-PCR-Technik etabliert. Hierzu wurde mit Hilfe des Ensembl Genomebrowsers (EMBL - EBI & Sanger Institute 2006) die genomische Exon-Intron-

Ausgehend von dieser Stocklösung wurden die Gebrauchslösungen durch eine 1:10-Verdünnung in RNase-freiem Wasser (Fa. Invitrogen) hergestellt. Die Lagerung der Stock- und der Gebrauchslösung erfolgte bei -20°C. Durchgeführt wurde die PCR mit einem Taq-PCR-Mastermix-Kit (Fa. Qiagen), bestehend aus RNase-freiem Wasser sowie dem Mastermix. Im Gesamtansatz von 25µL pro PCR-Gefäß wurden 12,5µL Mastermix, 11,5µL RNase-freies Wasser, 0,25µL jeden Primers und 0,5µL DNA zupipettiert (Endkonzentrationen, siehe Tabelle 3). Alle benötigten Reagenzien wurden unmittelbar vor dem Versuch aus dem Gefrier- oder Kühlschrank entnommen und direkt nach Gebrauch wieder gekühlt. Der Ansatz wurde auf Eispacks (Fa. Eppendorf) bei 4°C pipettiert, anschließend gevortex und in einer Tischzentrifuge kurz anzentrifugiert. Anschließend wurden die PCR-Gefäße in den Thermocycler (Fa. Biometra) überführt und das Programm (Tabelle 3) gestartet. Im Anschluss an die PCR wurde das PCR-Produkt nachdem ein Aliquot für die Gelelektrophorese entnommen wurde, bei -20°C eingefroren. Das entnommene Aliquot von 4µL wurde wie im Kapitel der DNA-Isolierung (3.14.1) beschrieben zusammen mit Bromphenolblau auf ein Ethidiumbromid-Gel aufgetragen. Zur Größenabschätzung des PCR-Produktes wurde pro Probenkamm eine DNA-Leiter (Fa. Sigma) mit 100bp-Abständen aufgetragen, die entsprechend den Angaben des Herstellers angesetzt wurde. Beim Pipettieren der Gele wurden um Kreuzkontaminationen zu vermeiden, die immer mitgeführten humanen Positivkontrollen separat angesetzt und mit einer Tasche Abstand zu den übrigen Proben auf das Gel aufgetragen. Zur Elektrophorese wurde eine Spannung von 90Volt für 40 – 45min angelegt. Danach wurde das Gel am Imager wie beschrieben aufgenommen.

3.14.4 Duplex-PCR zur quantitativen Bestimmung humaner DNA im murinen Gewebe

In Kooperation mit dem IZKF (Interdisziplinäres Zentrum für Klinische Forschung) der Universität Leipzig wurde der Anteil humaner DNA in mit Stammzellen transplantierten Mauslebern quantitativ untersucht. Hierzu wurde im IZKF eine Duplex-PCR-Technik etabliert (Pelz *et al.* 2005) und angewendet, bei der die α -satellite repeat Sequenz des humanen Chromosoms 7 (Warburton *et al.* 1991) und die repeat Sequenz des Mausechromosoms 8 (Boyle & Ward 1992) koamplifiziert werden. Im Probenansatz von 40µL PCR-Puffer (50mM KCl, 20mM MgCl₂, 0,5% Tween 20) waren 0,5mM dNTPs (dNTPs, engl. *Deoxynucleotide triphosphates*; Fa. Roche), 0,25µM jeden Primers, 2,5U Taq-Polymerase (Fa. Roche) und 1µL (ca. 10ng) DNA. Alle PCR-Reaktionen wurden in einem Gradiententhermocycler durchgeführt (Fa. Stratagene). Die PCR-Bedingungen wurden wie in (Pelz *et al.* 2005) beschrieben, gewählt.

3.15 *In vitro* Charakterisierung der Neohepatozyten

Neben der *in vivo* Charakterisierung nach Transplantation ins Versuchstier wurden die Neohepatozyten auch *in vitro* in verschiedenen Assays charakterisiert. Hierbei wurden die Assays für die Albumin- und Harnstoffsekretion, die 6 β -Hydroxylierung von Testosteron, die Immunhistochemie für Connexin 32, Cytokeratin 18 und Pan-Actin sowie die RT-PCR auf Clotting-Factor II und α -Fetoprotein in Kooperation mit der Uniklinik Kiel von Ruhnke et al. (Ruhnke *et al.* 2005c) durchgeführt. Als Parameter für die metabolische Aktivität der CYP1A-Isoenzyme wurde ein Ethoxyresorufin-O-Dealkylase-Assay (EROD) durchgeführt (Abbildung 9).

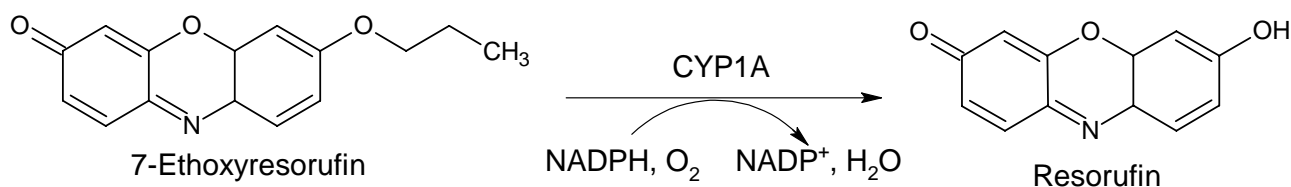


Abbildung 9: EROD-Assay als metabolischer Parameter für CYP1A-Isoenzyme

3.15.1 Induktion der Neohepatozyten

Für die Induktionsversuche wurden 25×10^6 periphere Blutmonozyten in einer 6-Well-Platte (Fa. Greiner) ausgesät und wie beschrieben zu Neohepatozyten differenziert (3.1.2). Am zehnten Tag der Differenzierung wurde der Induktionsversuch begonnen. Um die metabolische Aktivität der Cytochrom P450-Isoenzyme zu induzieren, wurden *in vitro* ausdifferenzierte Neohepatozyten für 72h mit 2,5 μ M 3-Methylcholanthren und 750 μ M Phenobarbital (beides Endkonzentrationen im Medium) in 3mL Differenzierungsmedium kultiviert. Die Stammlösung von 3-Methylcholanthren (Fa. Sigma-Aldrich) wurde in Ethanol, die von Phenobarbital (Apotheke Uniklinik Leipzig) in DMSO angesetzt. Aliquots beider Stammlösungen wurden in 1,5mL Eppendorfgefäßen bei -20°C gelagert. Vor Induktionsbeginn wurde jeweils ein Aliquot aus dem Gefrierfach entnommen und bei RT aufgetaut. Das Zellkulturmedium wurde mithilfe einer Absaugvorrichtung quantitativ abgenommen und durch genau 3mL frisches Differenzierungsmedium ersetzt (vgl. 3.1.2) Entsprechend Abbildung 10 wurde die Induktion der Zellen vorgenommen. Pro 6-Well-Platte wurde bei 2 Wells keine Induktion der Zellen vorgenommen, um einen möglichen Umsatz von 7-Ethoxyresorufin bei nicht-induzierten Neohepatozyten bestimmen zu können. Während der 72h Induktion wurde kein weiterer Medienwechsel mehr durchgeführt.

Am Tag der Messung wurde zunächst das verbrauchte Medium mit einer Absaugvorrichtung quantitativ abgenommen. Pro Well wurden genau 3mL frisches Differenzierungsmedium vorgelegt. Die Zugabe von 7-Ethoxyresorufin (Endkonzentration im Medium 1 μ M, La-

gerung bei -20°C ; Fa. Sigma-Aldrich) erfolgte wie in Abbildung 10 dargestellt. Pro Gruppe wurde hierbei jeweils ein Well ohne Substrat behandelt. Dadurch wurde kontrolliert, ob durch die Zellen wieder ins Medium abgegebenes 3-Methylcholanthren oder Phenobarbital die fluorometrische Bestimmung beeinflusst wird. Die Probennahmen wurden nach 1h und 4h durchgeführt. Hierzu wurde jeweils 1mL des Mediumüberstandes mit einer Eppendorf-Pipette abgenommen und bis zur fluorometrischen Messung 30min bei RT in Dunkelheit stehen gelassen. Die Bestimmung erfolgte an einem Fluorimeter (Fa. Jasco) bei einer Emissionswellenlänge von 590nm und einer Extinktionswellenlänge von 544nm (Langsch & Bader 2001). Die

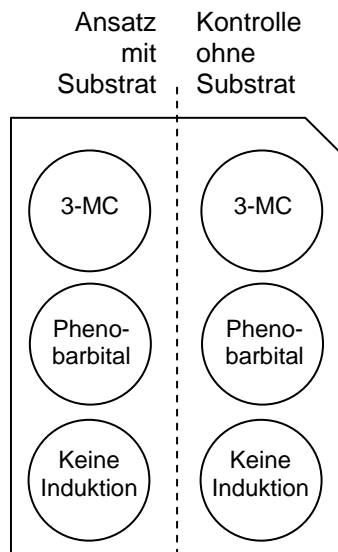


Abbildung 10 : Induktionsschema für Neohepatozyten

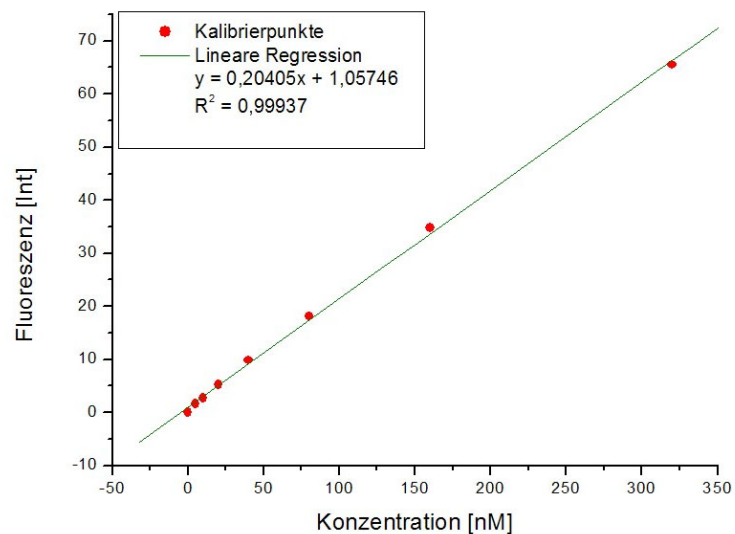


Abbildung 11: Resorufinkalibrierung und lineare Regression der Kalibrierung

Konzentrationsbestimmung wurde anhand einer Kalibriergerade (Abbildung 11) durchgeführt, die durch Verdünnung einer Stammlösung von Resorufin (Konzentration der Stammlösung 5mM in Ethanol, Lagerung bei -20°C ; Fa. Sigma-Aldrich) in Differenzierungsmedium, hergestellt wurde. Zur Messung wurden Plastikküvetten (Fa. Brand) verwendet. Als Nullwert wurde Medium ohne Zusatz von Resorufin verwendet.

3.15.2 Durchführung der Messung

Die Vermessung der Proben wurde am Tag der Substratzugabe durchgeführt. Am Fluorimeter wurden die zur Kalibrierung gewählten Einstellungen vorgenommen. Der Zeitpunkt 0h wurde durch Messung von leerem Medium ohne Substrat oder Induktor bestimmt. Gemessen wurde in der Reihenfolge der Probennahme. Nach Durchführung aller Bestimmungen wurden die Proben für eventuelle Nachbestimmungen in 1,5mL Eppendorf-Gefäße umgefüllt und bei -20°C gelagert.

4 Ergebnisse

4.1 Identifikation der transplantierten Zellen nach Markierung

Um die transplantierten Stammzellen nach der Explantation und Präparation der Leber ohne immunhistochemische Methoden oder *in situ* Hybridisierung im Gewebe wiederzufinden, wurden bei einem Teil der Versuche die Zellen vor der Transplantation *in vitro* markiert. Hierzu wurde zum einen der rotfluoreszierende Membranfarbstoff CM-DiI, zum anderen ebenfalls rotfluoreszierende Nanopartikel verwendet (Abbildung 12).

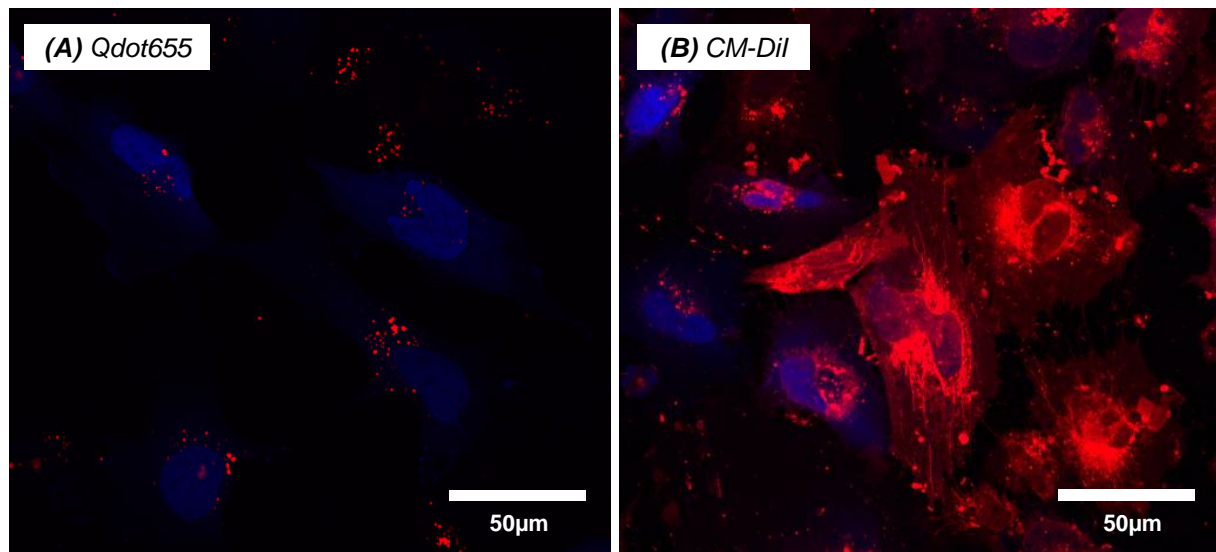


Abbildung 12:(A) Qdot655- und (B) CM-DiI-markierte Stammzellen (rot), Kernfärbung mit DAPI (blau).

4.1.1 CM-DiI

Transplantiert wurden jeweils 750.000 adhärent proliferierende Nabelschnurblutzel-
len oder *in vitro* aus peripheren Blutmonozyten vordifferenzierte Neohepatozyten. Die Zellen
wurden jeweils unmittelbar vor der Transplantation mit CM-DiI markiert (Abbildung 12B)
und dann in den linken Leberlappen von NOD/SCID-Mäusen injiziert. Die Präparation der
Lebern erfolgte nach 21d. Paraffinschnitte des explantierten Organs konnten vor Durchfüh-
rung weitergehender Techniken wie Immunhistochemie oder *in situ* Hybridisierung im Fluo-
reszenzmikroskop auf rotfluoreszierende Bereiche gescreent werden. Gefunden wurden hier-
bei sowohl einzelne rotfluoreszierende Zellen als auch größere rotfluoreszierende Areale
(Abbildung 13A und B) markierter Zellen. Diese Position positiver Stellen wurde notiert und
im Anschluss an Immunhistochemie und *in situ* Hybridisierung erneut ausgewertet. Der be-
sondere Vorteil der DiI-Markierung lag darin, dass die fluoreszierenden Bereiche auch nach
der Aufbereitung und der Durchführung von Immunhistochemie und *in situ* Hybridisierung
wiedergefunden werden konnten. Durch diese Beständigkeit ist es möglich, eine eventuelle

Kolokalisierung mit der Expression von Hepatozytenmarkern wie humanes Albumin und/oder *Alu*-positiven Kerben zu finden.

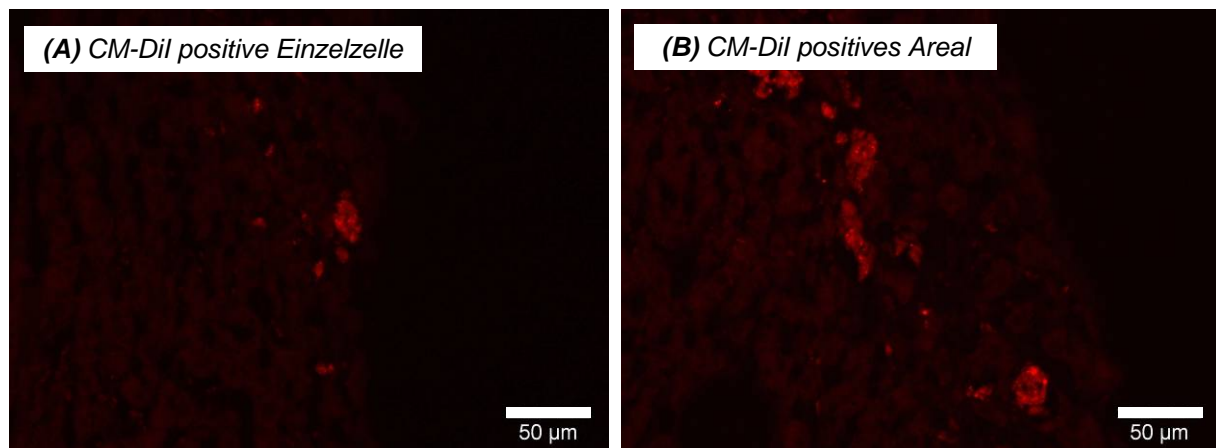


Abbildung 13: (A) CM-Dil positive Einzelzelle und (B) CM-Dil positives Areal im transplantiertem Mausegewebe.

4.1.2 Qdot655 Nanopartikel

In einem anderen Versuch wurden adhärent proliferierende Nabelschnurblutzellen mit Qdot655-Nanopartikeln markiert (Abbildung 12A). Um zu verfolgen, wie sich die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der Transplantation verhielten, wurden die Lebern von je drei NOD/SCID-Mäusen nach Injektion von 750.000 markierten Zellen nach 4h, 12h, 24h, 5d und 21d explantiert und präpariert. Bei Anregung mit UV-Licht und Verwendung eines Fluoreszenzfilters für DAPI ließen sich die Nanopartikel im Paraffinschnitt ohne jede weitere Vorbereitung wiederfinden. Tabelle 4 zeigt die Anzahl Qdot-positiver Areale und Einzelzellen pro Explantationszeitpunkt. Der Median der gefundenen Bereiche mit Nanopartikeln erreichte 12h nach Transplantation seinen höchsten Wert und nahm dann bis hin zum 21d-Zeitpunkt ab. Der Anstieg der gefundenen Qdot-positiven Areale von 4h zu 12h war überraschend. Gründe für diesen Verlauf werden im 5.3 diskutiert.

Tabelle 4: Anzahl der Qdot-positiven Bereiche in transplantiertem Gewebe zu verschiedenen Zeitpunkten nach Explantation der Leber.

Zeit zwischen Injektion und Explantation	Maus 1	Maus 2	Maus 3	Median (Mittelwerte) der Mäuse 1 bis 3
4h	11	69	22	22 (34)
12h	510	49	199	199 (252,6)
24h	27	180	101	101 (102,6)
5d	34	tot	35	34,5 (34,5)
21d	2	32	6	6 (13,3)

Mit zunehmender Zeit der Transplantation veränderte sich die Morphologie der gefundenen Qdot-positiven Zellcluster. Charakteristisch für die Lebern der frühen Explantati-

onszeitpunkte von 4h bis 24h nach Injektion der Zellen waren größere Areale mit rotfluoreszierenden Partikeln. Diese lagen teils wie ein Saum um stark entzündetes Lebergewebe, teils in dem entzündeten Gewebe (Abbildung 14A-D).

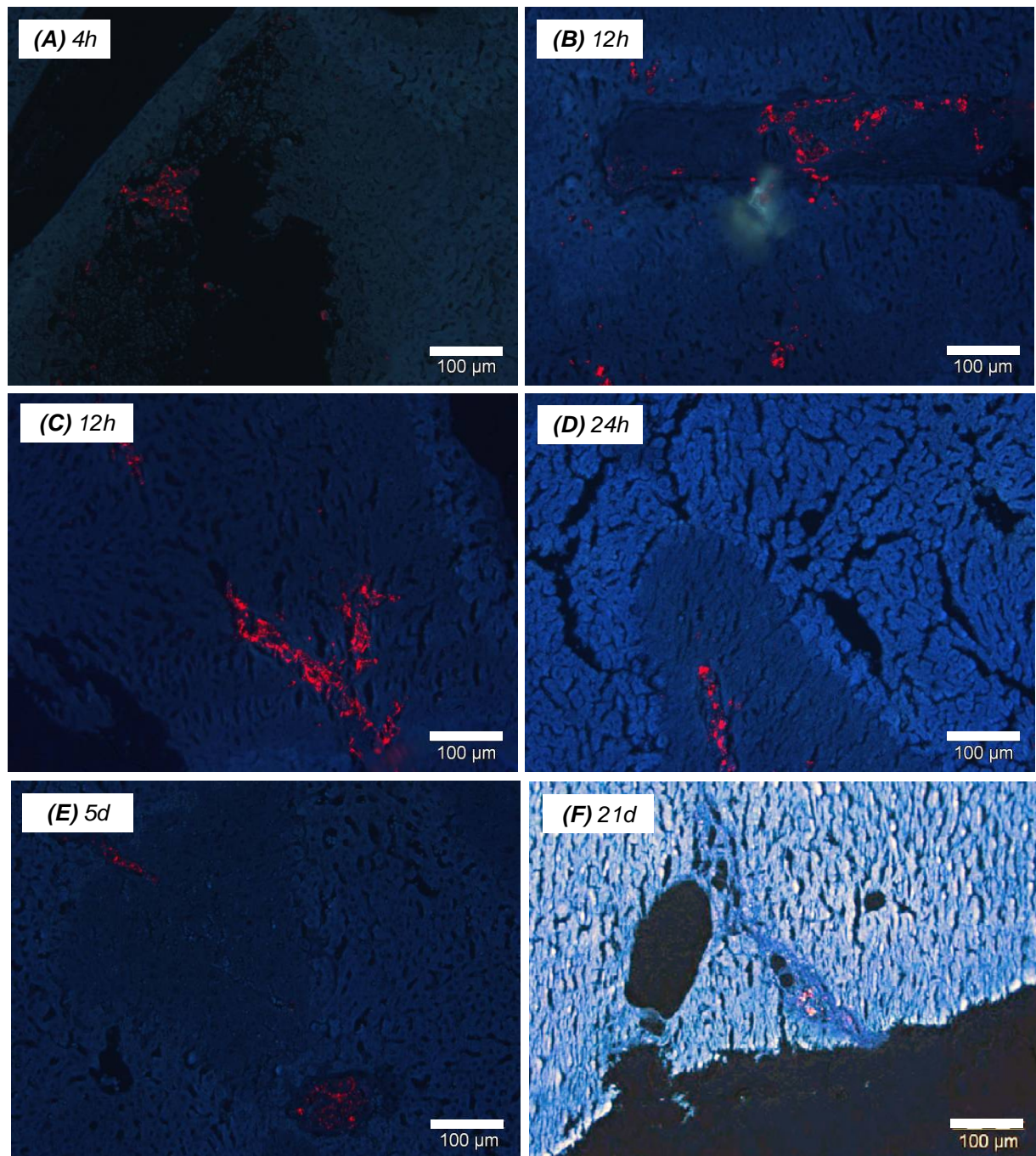


Abbildung 14: (A-F) Verschiedene Zeitpunkte der Explantation nach Transplantation von 750.000 Qdot655-markierten Zellen ins Leberparenchym. In (A-E) sind entzündete oder nekrotische Leberareale erkennbar, die nach 21d (F) nicht mehr gefunden wurden. Die Aufnahmen wurden nach UV-Anregung unter Verwendung eines DAPI-Filters aufgenommen. Qdot655-positive Signale (rot) lassen sich gut vom paraffinisierten Gewebe (blau) unterscheiden.

Fünf Tage nach Injektion der Zellen nahm die Anzahl positiver Signale ab. Qdot-positive Zellen wurden häufig innerhalb oder im Randbereich nekrotischen Gewebes gefunden (Abbildung 14E). Drei Wochen nach Transplantation der markierten Zellen wurden nur noch vereinzelt Zellen mit rotfluoreszierenden Partikeln gefunden (Abbildung 14F). Entzün-

dete oder nekrotische Bereiche waren nicht mehr zu erkennen. Anders als CM-DiI war die Fluoreszenz der Qdot655-Partikel nach Durchführung der Immunhistochemie nicht mehr sichtbar. Aussagen über eine Kolo-kalisation von Partikeln mit Markern humaner Zellen konnten nur indirekt durch eine Übereinanderlagerung von vor dem Versuch und nach dem Versuch aufgenommenen Bildern erfolgen. Aufgrund der Veränderung des Gewebes durch thermische Belastung in der *in situ* Hybridisierung kann es schwer sein, die Qdot-positiven Bereiche nach der Hybridisierung wieder zu finden. Für die Immunhistochemie konnte im Rahmen der Ungenauigkeit der Methode eine Überlagerung der Bilder durchgeführt werden. Aufgrund dieses Nachteils eignet sich die Markierung der Zellen mit den Qdot655-Nanokristallen anders als die DiI-Markierung nur bedingt, um eine Kolo-kalisation der markierten Zellen mit humanen Faktoren zu finden. Eine Besonderheit der Qdot655-Partikel ist, dass diese sich über einen großen Bereich des Wellenspektrums anregen lassen und auch bei Verwendung von energiereichem UV-Licht zur Anregung nicht ausbleichen.

4.2 Analyse humaner Hepatozytenfaktoren (Albumin und HepPar)

Durch die Analyse humaner Hepatozytenfaktoren sollte untersucht werden, ob eine zumindest teilweise Differenzierung der transplantierten Zellen stattgefunden hat. Hierzu wurde in erster Linie die immunhistochemische Detektion humanen Albumins mit DAB durchgeführt. Albumin ist ein spezifischer Hepatozyten-Marker, der bereits in frühen Stadien der Differenzierung nachweisbar ist. Durch den HepPar-Antikörper lassen sich humane Hepatozyten spezifisch von anderen humanen Zelltypen differenzieren.

4.2.1 Immunhistochemische Detektion humanen Albumins

4.2.1.1 Speziespezifität und Sensitivität der Methode

Albumin ist ein über Speziesgrenzen hinweg hochkonserviertes Protein. Dadurch ist es möglich, dass Kreuzreaktionen eines Antikörpers gegen humanes Albumin mit Albumin anderer Spezies auftreten können und somit zu falsch-positiven Ergebnissen führen. Um im verwendeten Modell humanes Albumin sicher detektieren zu können, wurden zur Kontrolle der Methode mehrfach mit physiologischer Kochsalzlösung, FCS oder William's Medium E scheintransplantierte NOD/SCID-Lebern untersucht (Tabelle 5). Da die Kontrollen ein Volumen von 100µL direkt in das Leberparenchym des linken Lappens injiziert bekamen, wurden hierbei einer echten Transplantation vergleichbare Verletzungen verursacht. Zum Resuspendieren der Zellen wurde bei den Transplantationsversuchen Zellkulturmedium verwendet. Darin ist 10% fetales Kälberserum enthalten, was eine Vielzahl an Wachstumsfaktoren und Proteinen enthält, die ebenfalls zu Kreuzreaktionen des Antikörpers führen könnten. Um diesen Einfluss auszuschließen, wurden auch Mäuse mit reinem FCS sowie Zellkulturmedium

scheintransplantiert. Bei 126 untersuchten Schnitten aller drei Gruppen wurden insgesamt 9 falsch-positive Strukturen gefunden, was 0,07 falsch-positiven Signalen pro Schnitt entspricht (Tabelle 5).

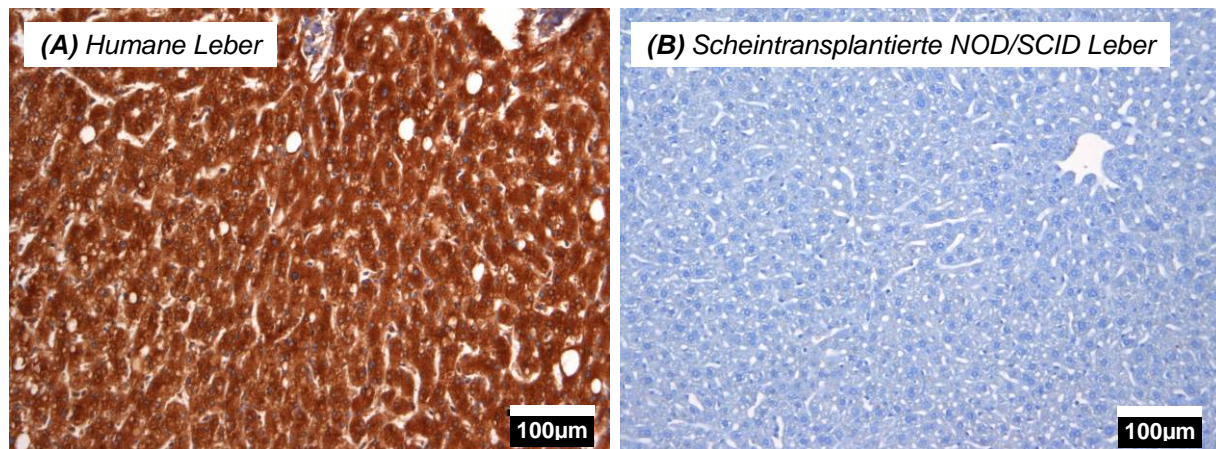


Abbildung 15: (A) Humane Leber als Positivkontrolle und (B) scheintransplantierte NOD/SCID-Leber als Negativkontrolle in der Immunhistochemie auf humanes Albumin. Human Albumin-positive Zellen sind braun (DAB). Gegenfärbung mit Mayers Hämalaun, die Kerne sind hierbei dunkelblau und das Zytoplasma hellblau gefärbt.

Die wenigsten falsch-positiven Strukturen wurden bei Injektion von William's Medium E gefunden, welches auch zum Resuspendieren der Zellen vor Transplantation verwendet wurde. Bei gleicher immunhistochemischer Färbung lieferten die als Positivkontrollen mitgeführten Humanlebern stets ein zellulär positives Signal. Abbildung 15 verdeutlicht die Spezifität des Antikörpers gegen humanes Albumin im verwendeten Tiermodell.

Tabelle 5: Übersicht über mit verschiedenen Medien scheintransplantierte Mäuse

Injektionsmedium	Anzahl transplanterter Mäuse (Schnitte)	Mittelwert huAlb-positiver Strukturen / Schnitt
NaCl	1 (12)	0,17
FCS	2 (22)	0,14
William's Medium E	8 (92)	0,04

4.2.1.2 Immunhistochemische Kontrolle der transplantierten Stammzellen

In diesem Versuch sollte überprüft werden, ob in den verwendeten Stammzellen bereits vor der Transplantation ins Versuchstier humanes Albumin immunhistochemisch nachweisbar war. Dazu wurden adhärent proliferierende Nabelschnurblutzellen und hepatopankreatische Vorläuferzellen auf SuperfrostPlus-Objektträgern kultiviert. Nachdem der Objektträger mit Zellen bewachsen war, wurden diese fixiert und immunhistochemisch auf humanes Albumin untersucht. Als Positivkontrolle dienten hierbei ebenfalls auf Objektträgern kultivierte HepG2-Zellen (humane hepatozelluläre Karzinomzelllinie). Die immunhistochemische Detektion humanen Albumins ist sowohl bei auf Objektträgern kultivierten Nabelschnurblutzellen, als auch bei hepatopankreatischen Zellen negativ (Abbildung 16B und C. In

der Positivkontrolle (Abbildung 16A1 und A2) ist eine zytoplasmatische Braunfärbung er-

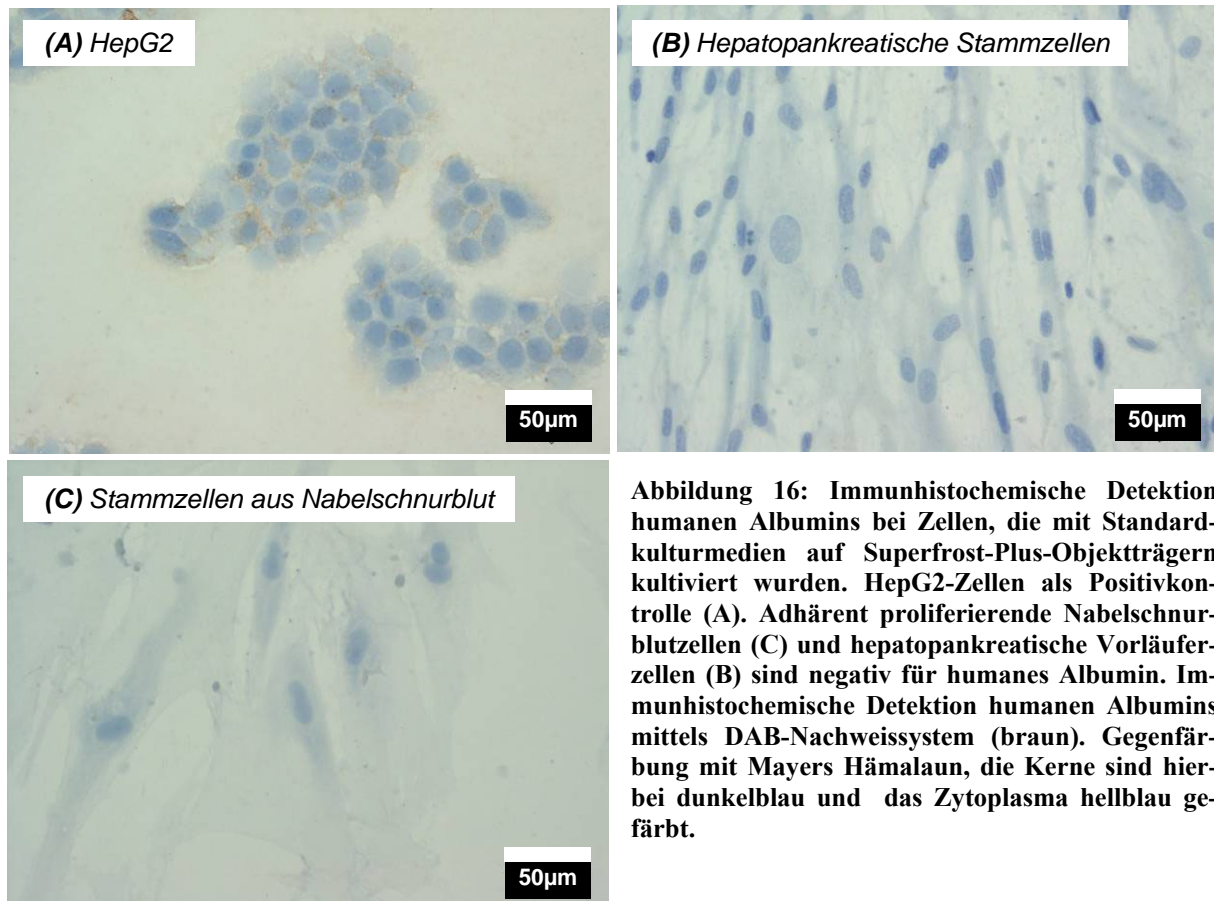


Abbildung 16: Immunhistochemische Detektion humanen Albumins bei Zellen, die mit Standardkulturmedien auf Superfrost-Plus-Objektträgern kultiviert wurden. HepG2-Zellen als Positivkontrolle (A). Adhärenz proliferierende Nabelschnurblutzellen (C) und hepatopankreatische Vorläuferzellen (B) sind negativ für humanes Albumin. Immunhistochemische Detektion humanen Albumins mittels DAB-Nachweissystem (braun). Gegenfärbung mit Mayers Hämalaun, die Kerne sind hierbei dunkelblau und das Zytoplasma hellblau gefärbt.

kennbar. Da sich die *in vitro* differenzierten Neohepatozyten nicht auf Objektträgern kultivieren ließen, wurde hierbei keine Immunhistochemie durchgeführt. Für die Neohepatozyten ist zu erwarten, dass diese bereits Albumin-produzierend sind. In Kooperation durchgeführte Kontrollen des Mediumüberstandes von Neohepatozyten-Kulturen zeigten eine Albumin-Sekretion ins Medium, die der primärer humaner Hepatozyten ähnlich ist (Ruhnke *et al.* 2005b).

4.2.1.3 Transplantation humaner Primärhepatozyten als Positivkontrolle

Um zu bestätigen, dass sich humanes Albumin auch in transplantiertem Gewebe nachweisen lässt, wurden 750.000 primäre humane Hepatozyten in den linken Leberlappen

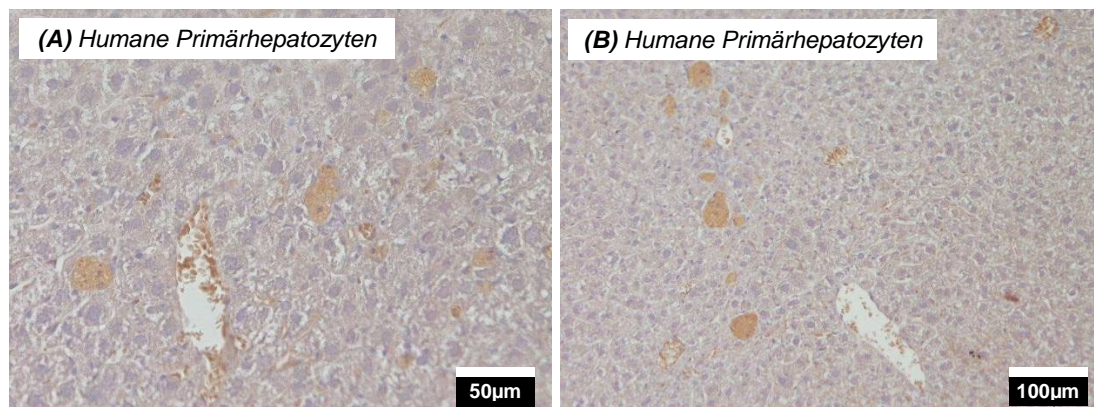


Abbildung 17: (A,B) Human Albumin-positive Zellen 21d nach Transplantation primärer humaner Hepatozyten in das Parenchym des linken Leberlappens. Human Albumin-positive Zellen sind braun (DAB). Die Gegenfärbung wurde mit Mayers Hämalaun durchgeführt, die Kerne sind hierbei dunkelblau und das Zytoplasma hellblau gefärbt.

von 8 NOD/SCID-Mäusen injiziert. Nach 21d erfolgte die Explantation und Präparation der Lebern. In 64 untersuchten Schnitten wurden 1,86 positive Strukturen pro Schnitt in der Immunhistochemie auf humanes Albumin (Abbildung 17) gefunden.

4.2.1.4 Human Albumin-positive Zellen nach Transplantation adhärent proliferierender Nabelschnurblutzellen

Im folgenden Experiment sollte mithilfe immunhistochemischer Methoden untersucht werden, ob als Folge der Transplantation humaner Stammzellen human Albumin-positive Zellen im transplantierten Gewebe gefunden werden können. Dazu wurden verschiedene Transplantationsversuche (Tabelle 6) durchgeführt.

Tabelle 6: Transplantationen von jeweils 750.000 adhärent proliferierenden Nabelschnurblutzellen in das Parenchym des linken Leberlappens von NOD/SCID-Mäusen. Explantation zu den angegebenen Zeitpunkten (4h bis 21d).

Markierung der Stammzellen	Anzahl der explantierten Lebern nach...				
	4h	12h	24h	5d	21d
Ohne Markierung	0	0	0	0	10+13 [*] +8 ^{*#}
DiI-Markierung	0	0	2	0	4
Qdot655-Markierung	3	3	3	3	12
Σ	3	3	5	3	47

[#]150.000 Zellen transplantiert, ^{*}SCID-Mäuse

Experimente mit frühen Explantationszeitpunkten (4h, 12h, 24h und 5d) wurden primär durchgeführt, um den zeitlichen Verlauf des Schicksals der transplantierten Zellen verfolgen zu können. Bei immunhistochemischen Färbungen an Schnitten der frühen Zeitpunkte (4h, 12h, 24h und 5d) wurden auf jedem der Schnitte falsch-positive Strukturen gefunden. Auf vergleichsweise untersuchten Schnitten eines zeitlichen Verlaufs von scheintransplantiertem Gewebe wurden für die frühen Zeitpunkte bis 5d ebenfalls falsch-positive Signale gefunden. Durch die bei den frühen Zeitpunkten noch vorhandenen entzündeten oder nekrotischen Bereiche entstehen möglicherweise unspezifische Bindungsstellen für den verwendeten Antikörper. Dieser könnte dann kreuzreagieren und somit ein falsch-positives Signal liefern. Da die nekrotischen und entzündeten Areale in den Kontrollen nach 21d nicht mehr auftraten, wurden zur immunhistochemischen Auswertung nur die 21d Zeitpunkte aller in Tabelle 6 aufgeführten Experimente genutzt. Zur methodischen Kontrolle wurden bei jedem Färbegang Negativkontrollen mitgeführt. Insgesamt wurden 278 Schnitte von Lebern untersucht, die drei Wochen nach Transplantation präpariert wurden. Human Albumin-positive Strukturen wurden in 156 Schnitten gefunden. Es wurden zwischen 0,13 und 3,8 eindeutig positive Strukturen pro Schnitt und Experiment gezählt (Mittelwert: 0,95 Strukturen pro Schnitt über alle Experimente). Bei der mikroskopischen Auswertung fielen zwei morphologisch voneinander un-

terschiedliche Typen Albumin-positiver Zellen auf. Der seltenere erste Typ (Typ I) human Albumin-positiver Zellen (Abbildung 18A und B) ist hinsichtlich der polygonalen Grundform und Größe sowie dem Kern-Zytoplasma-Verhältnis einer echten Hepatozyte sehr ähnlich.

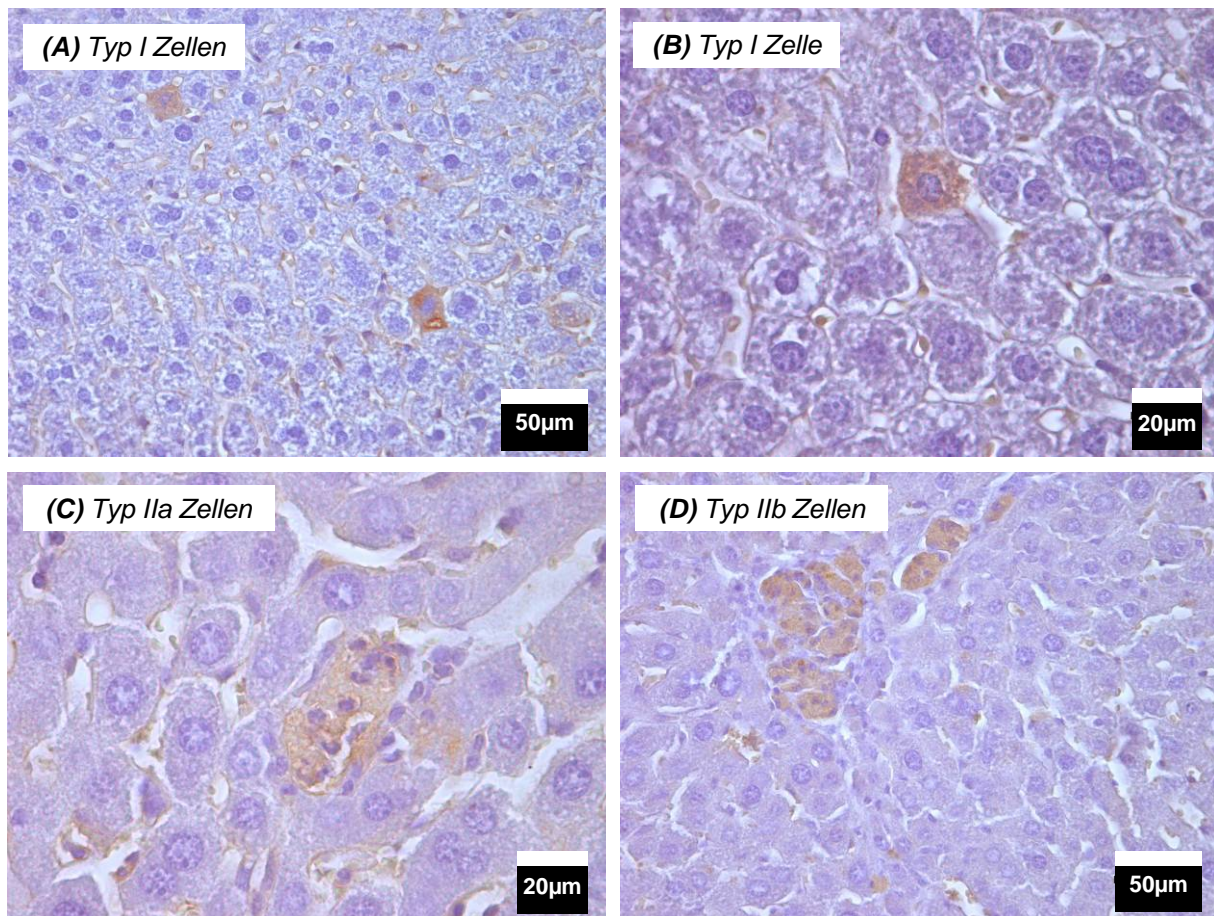


Abbildung 18: Beispiele für human Albumin-positive Zellen des Typs I (A, B), des Typs IIa (C) und Typ IIb (D) 21d nach Transplantation von 750.000 adhärent proliferierenden Nabelschnurblutzellen in das Parenchym des linken Leberlappens von NOD/SCID-Mäusen. Human Albumin-positive Zellen sind braun (DAB). Die Gegenfärbung wurde mit Mayers Hämalaun durchgeführt, die Kerne sind hierbei dunkelblau und das Zytoplasma hellblau gefärbt.

Eine Unterscheidung von murinen Hepatozyten des umgebenden Gewebes ist bei Typ I-Zellen anhand der Morphologie nicht möglich. Typ I-Zellen traten vereinzelt in nicht miteinander zusammenhängenden Arealen auf. Häufiger wurden kleinere Zellagglomerate, die je nach Lage als Typ IIa (im Gefäß liegend), oder Typ IIb (im Gewebe integriert) bezeichnet wurden (Abbildung 18C und D). Die human Albumin-positiven Typ II-Zellen weisen keine Hepatozyten-ähnliche Morphologie auf. Durch die Häufung in Zellagglomeraten sind echte Zellgrenzen schwer zu erkennen. Verglichen mit den Hepatozyten-ähnlichen Typ I-Zellen sind die Typ II-Zellen kleiner, haben einen dezentral gelegenen kleineren Kern sowie ein zum Zytoplasma verschobenes Kern-Zytoplasma-Verhältnis. Der Anteil der Typ II-Zellen (Typ IIa und b) an allen human Albumin-positiven Strukturen ist mit 68% deutlich höher als der Anteil der Typ I-Zellen mit 32%.

4.2.1.5 Weitere Zelltypen

Neben den adhärent proliferierenden Nabelschnurblutzellen wurde auch das *in vivo* Schicksal zweier weiterer Zelltypen untersucht. Hierbei sollte verglichen werden, ob hepatopankreatische Vorläuferzellen (nativ und immortalisiert) und Neohepatozyten nach Transplantation ins Tiermodell ein ähnliches Potential zur Bildung humanen Albumins *in vivo* haben wie die Nabelschnurblutzellen.

4.2.1.5.1 Untersuchung auf Albumin Expression nach Transplantation hepatopankreatischer Stammzellen

Zwei Typen hepatopankreatischer Stammzellen wurden miteinander verglichen (Tabelle 6). Während der ersten Studie wurden native Nestin-positive Zellen aus dem humanen Pankreas in die Leber von vier SCID-Mäusen transplantiert. Nach 21d erfolgte die Explantation und immunhistochemische Untersuchung. In der zweiten Studie wurden immortalisierte Zellen des nativen Typs in das Parenchym von 10 SCID- und 4 NOD/SCID-Mäusen transplantiert.

Tabelle 7: Transplantationen von jeweils 750.000⁺ hepatopankreatischen Vorläuferzellen in das Parenchym des linken Leberlappens immundefizienter Mäuse.

Hepatopankreatischer Zelltyp	Tiermodell	Anzahl explantierter Lebern nach 21d
Native Zellen	SCID-Maus	4 ⁺
Immortalisierte Zellen	SCID-Maus	10 ⁺⁺
	NOD/SCID-Maus	4

⁺2 SCID-Mäuse mit nur 150.000 Zellen transplantiert

⁺⁺6 der Mäuse wurden extern an der Universität Mainz von Dr. Marc von Mach transplantiert

Bei Auswertung von 32 Schnitten der mit nativen Zellen transplantierten Mäuse wurden 0,7 positive Strukturen (Mittelwert) pro Schnitt in der Immunhistochemie auf humanes Albumin gefunden. In allen 112 untersuchten Schnitten von mit immortalisierten Zellen transplantierten SCID- und NOD/SCID-Mäusen wurden 4,6 human Albumin-positive Strukturen (Mittelwert) pro Schnitt gefunden. Hierbei zeigten die beiden hepatopankreatischen Vorläuferzellen starke Unterschiede in der Verteilung von Typ I und Typ II-Zellen (Abbildung 19). Während bei der nativen Form ein ähnliches Verhältnis wie bei den adhärent proliferierenden Nabelschnurblutzellen gefunden wurde, war der Zelltyp II bei den immortalisierten Zellen dominierend. Die Größe und Ausdehnung der Typ II-Zellagglomerate war bei den immortalisierten hepatopankreatischen Zellen deutlich ausgeprägter als bei den adhärent proliferierenden Nabelschnurblutzellen und den nativen hepatopankreatischen Stammzellen.

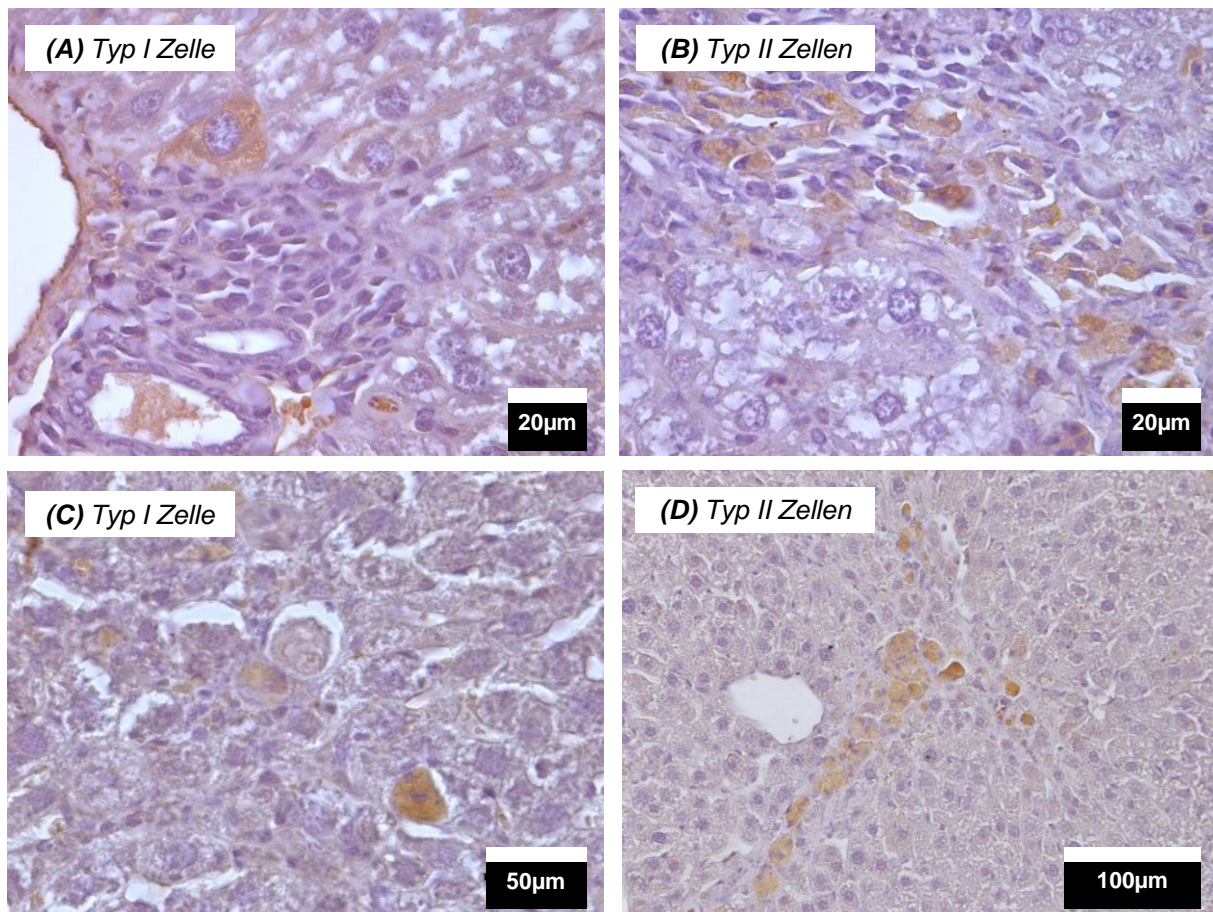


Abbildung 19: Typ I und Typ II-Zellen 21d nach Transplantation von (A, B) nativen und (C, D) immortalisierten hepatopankreatischen Vorläuferzellen in das Parenchym des linken Leberlappens. Human Albumin-positive Zellen sind braun (DAB). Die Gegenfärbung wurde mit Mayers Hämalaun durchgeführt, die Kerne sind hierbei dunkelblau und das Zytoplasma hellblau gefärbt.

4.2.1.5.2 Untersuchung auf Albumin Expression nach Transplantation von Neohepatozyten

In diesem Experiment wurden *in vitro* aus peripheren Blutmonozyten generierte Neohepatozyten transplantiert. Hierzu wurden die Blutmonozyten zunächst innerhalb von 6d durch ein Dedifferenzierungsmedium in einen dedifferenzierten Zustand überführt (Ruhnke *et al.* 2005c). Diese programmierbaren Zellen ließen sich durch nachfolgende Kultur für 10-12d in Differenzierungsmedium zu Neohepatozyten differenzieren. Jeweils 750.000 Neohepatozyten wurden in den linken Leberlappen von 19 NOD/SCID-Mäusen transplantiert (Tabelle 8). Nach 2d, 21d und 2 Monaten erfolgte die Explantation und Aufarbeitung der transplantierten Leber. Durch diese drei Zeitpunkte sollte das Kurzzeit- und das Langzeitschicksal der transplantierten Neohepatozyten untersucht werden. Immunhistochemisch wurden die 21d und 2 Monatsmäuse auf das Vorhandensein humanen Albumins untersucht. Der 2d-Zeitpunkt wurde nicht immunhistochemisch untersucht, da hierbei aufgrund der Entzündungen des Lebergewebes mit Kreuzreaktionen des Antikörpers und somit mit falsch-positiven Ergebnissen zu rechnen ist.

Tabelle 8: Transplantationen von jeweils 750.000 aus peripheren Blutmonozyten gewonnenen Neohepatozyten mit und ohne DiI-Markierung in das Parenchym des linken Leberlappens von NOD/SCID-Mäusen. Explantation zu den angegebenen Zeitpunkten (2d bis 2 Monate).

Markierung der Stammzellen	Anzahl der explantierten Lebern nach...		
	2d	21d	2 Monaten
Ohne Markierung	0	4	0
DiI-Markierung	4	5	6
Σ	4	9	6

In 32 Paraffinschnitten der 21d-Mäuse konnten pro Schnitt 1,3 (Mittelwert) human Albumin-positive Strukturen gefunden werden. Die bei Transplantation von Nabelschnurblutstammzellen und hepatopankreatischen Vorläuferzellen gefundenen Typen human Albumin-positiver Strukturen lassen sich auch hier beobachten (Abbildung 20), mit einem ähnlichen Verhältnis wie bei adhärent proliferierenden Nabelschnurblutzellen. Unter gleichen Bedingungen wurden zwei Monate nach Transplantation keine human Albumin-positiven Zellen gefunden.

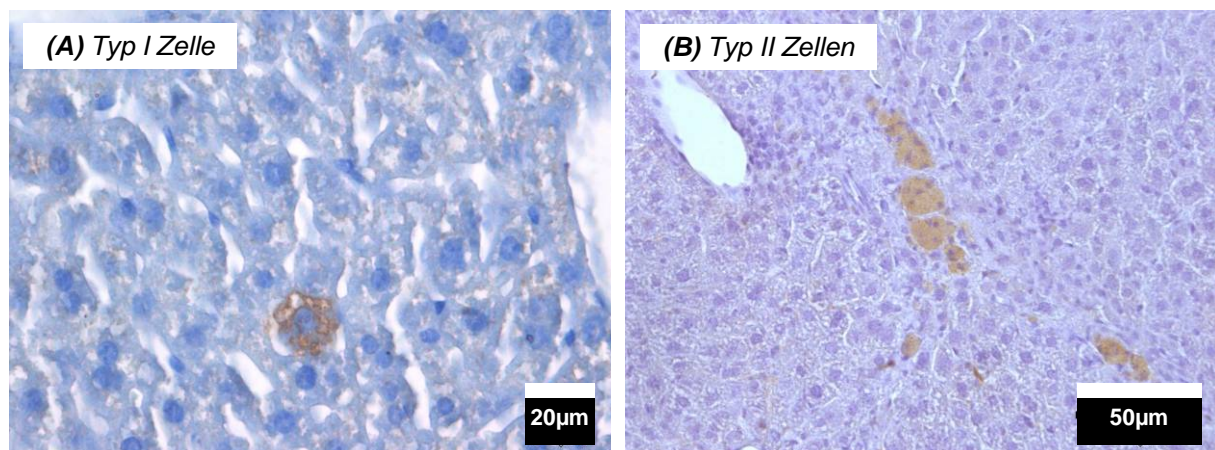


Abbildung 20: Typ I und Typ II-Zellen 21d nach Transplantation von aus peripheren Blutmonozyten generierten Neohepatozyten in das Parenchym des linken Leberlappens. Nach 2 Monaten konnten keine human Albumin-positiven Strukturen gefunden werden. Human Albumin-positive Zellen sind braun (DAB). Die Gegenfärbung wurde mit Mayer's Hämalaun durchgeführt, die Kerne sind hierbei dunkelblau und das Zytoplasma hellblau gefärbt.

4.2.1.6 Transplantation adhärent proliferierender Nabelschnurblutzellen in uPA/RAG-Mäuse

Durch Transplantation von adhärent proliferierenden Nabelschnurblutzellen in die Lebern von uPA/RAG-Mäusen wurde der Einfluss einer Leberschädigung auf die injizierten Zellen untersucht. Zusätzlich wurde in diesem Experiment neben der direkten Injektion der Zellen in das Leberparenchym (drei Mäuse) bei einer zweiten Gruppe Mäuse (fünf Mäuse) eine Injektion der Zellen via Milz durchgeführt. Hierbei wurden pro Maus 750.000 Stammzellen injiziert (Tabelle 4). Die Explantation wurde nach 21d durchgeführt.

Tabelle 9: Transplantation von jeweils 750.000 adhären proliferierenden Nabelschnurblutzellen in uPA/RAG-Mäuse. Vergleich zweier Injektionsmethoden am lebertoxischen Mausmodell.

Transplantation der Zellen	Tiermodell	Anzahl transplanteder Mäuse
direkt ins Parenchym	uPA/RAG-Maus	3
via Milz	uPA/RAG-Maus	5

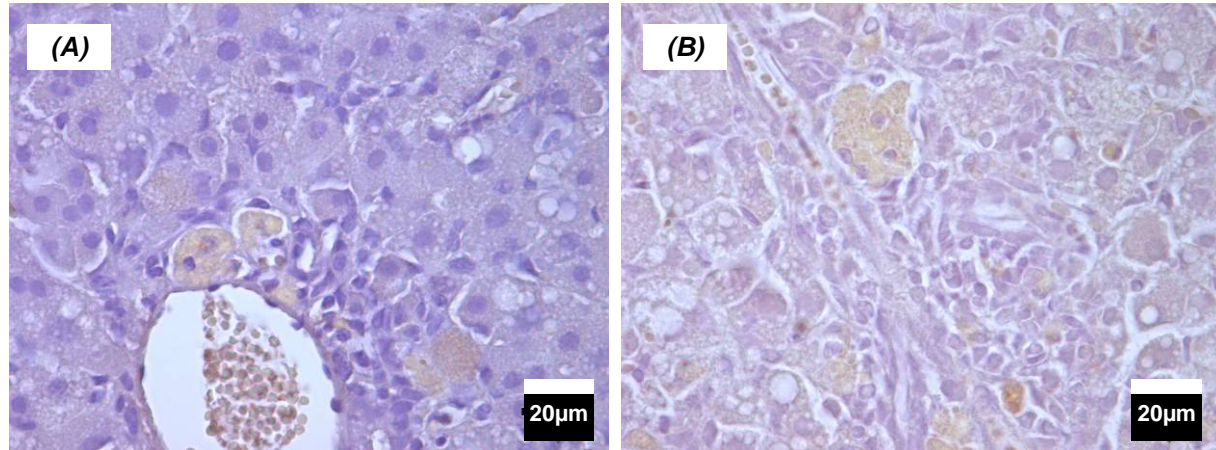


Abbildung 21: Human Albumin-positive Strukturen 21d nach Transplantation von 750.000 adhären proliferierender Nabelschnurblutzellen (A) direkt ins Leberparenchym, oder (B) via Milz. Human Albumin-positive Zellen sind braun (DAB). Die Gegenfärbung wurde mit Mayers Hämalaun durchgeführt, die Kerne sind hierbei dunkelblau und das Zytoplasma hellblau gefärbt.

In der immunhistochemischen Auswertung wurden bei den via Milz transplantierten Mäusen insgesamt 5 eindeutig human Albumin-positive Strukturen in 40 untersuchten Schnitten gefunden (Mittelwert pro Schnitt: 0,13). Demgegenüber wurden in 24 untersuchten Schnitten der direkt ins Parenchym transplantierten Mäuse insgesamt 12 eindeutig human Albumin-positive Strukturen (Mittelwert pro Schnitt: 0,5) beobachtet. Im Vergleich zur Transplantation von adhären proliferierenden Nabelschnurblutzellen in immundefiziente NOD/SCID- und SCID-Mäuse wurde demnach keine Zunahme der Zahl human Albumin-positiver Strukturen gefunden. Für weitere Transplantationsversuche wurde anstelle des lebertoxischen uPA/RAG-Modells das leichter handhabbare NOD/SCID-Tiermodell verwendet. Aufgrund der geringeren Zahl human Albumin-positiver Strukturen bei Injektion via Milz, wurde in allen weiteren Experimenten die Transplantation direkt ins Leberparenchym durchgeführt. In Abbildung 21 sind einige der Albumin-positiven Zellen abgebildet.

4.2.2 Kombinierte Immunhistochemie zur simultanen Detektion humanen und murinen Albumins

Um einen Hinweis zu bekommen, ob die human Albumin-positiven Zellen durch Transdifferenzierung oder durch Fusion entstanden sind, wurde eine simultane Detektion humanen und murinen Albumins durchgeführt. Hierzu wurden exemplarisch Schnitte untersucht, die native hepatopankreatische Stammzellen transplantiert bekamen (vgl. Tabelle 7). Für die gleichzeitige Darstellung beider Antigene in einem Schnitt wurde ein fluoreszierendes

Nachweissystem verwendet. In Abbildung 22 ist zu erkennen, dass die human Albumin-positive Zelle (Cy3, rotfluoreszierend) negativ für murines Albumin (Cy2, grünfluoreszierend) ist. Weiterführende Untersuchungen der Identität der human Albumin-positiven Zellen wurde mit der Technik der *in situ* Hybridisierung durchgeführt (siehe 4.4).

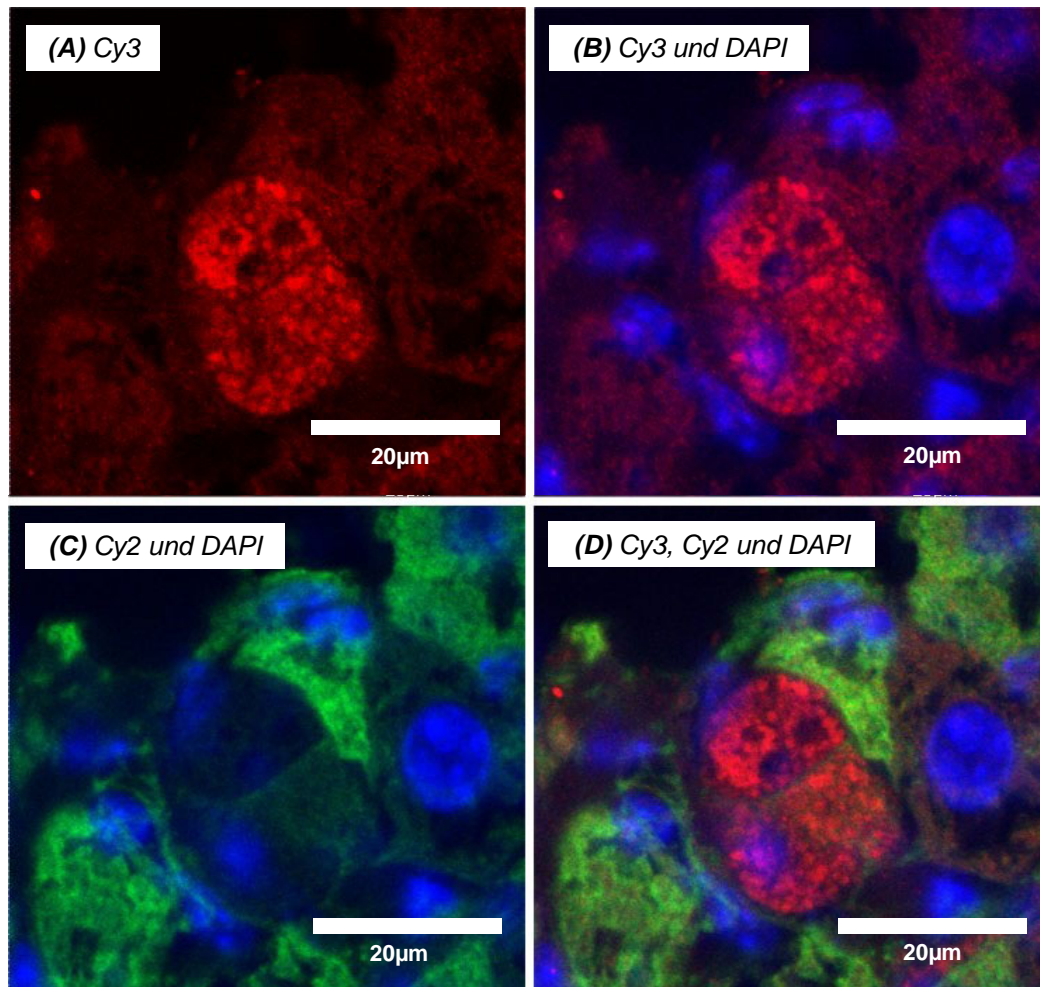


Abbildung 22: (A, B, D) human Albumin-positive Zelle 21d nach Transplantation 750.000 nativer hepatopankreatischer Vorläuferzellen. (C, D) Die human Albumin-positive Zelle ist gleichzeitig negativ für murines Albumin (dunkle Aussparung in grünfluoreszierender Umgebung). Immunhistochemische Detektion humanen Albumins (Cy3, rot) und murinen Albumins (Cy2, grün), Kerngegenfärbung mit DAPI (blau).

4.2.3 Immunhistochemische Detektion des HepPar-Antigens

Mit dem HepPar-Antikörper sollte ein Marker, der spezifisch humane Hepatozyten erkennt, etabliert werden. Da dieser monoklonale Antikörper aus der Maus gewonnen wird, konnte keine herkömmliche Detektion mit einem Zweitantikörper, der gegen die Spezies des Erstantikörpers gerichtet ist, durchgeführt werden. Um eine Maus-in-Maus-Detektion durchführen zu können, wurde der Antikörper vor der Inkubation biotinyliert. Die Sichtbarmachung erfolgte wie bei der Albumin-Immunhistochemie über DAB.

4.2.3.1 Speziesspezifität und Sensitivität

Aufgrund der Speziesproblematik der Detektion des Erstantikörpers wurde der Antikörper nur für 15min bei RT inkubiert, da ansonsten vermehrt in den scheintransplantierten Kontrollen falsch-positive Zellen gefunden wurden (Abbildung 23D). Sehr gut differenziert der Antikörper hingegen verschiedene humane Zelltypen, wie sie auch in menschlichen Lebern vorkommen. Da für die Versuche überwiegend zirrhotische humane Lebergewebe verwendet wurden, ließen sich die Hepatozyten sehr gut von weiteren Leberzelltypen unterscheiden (Abbildung 23A und B).

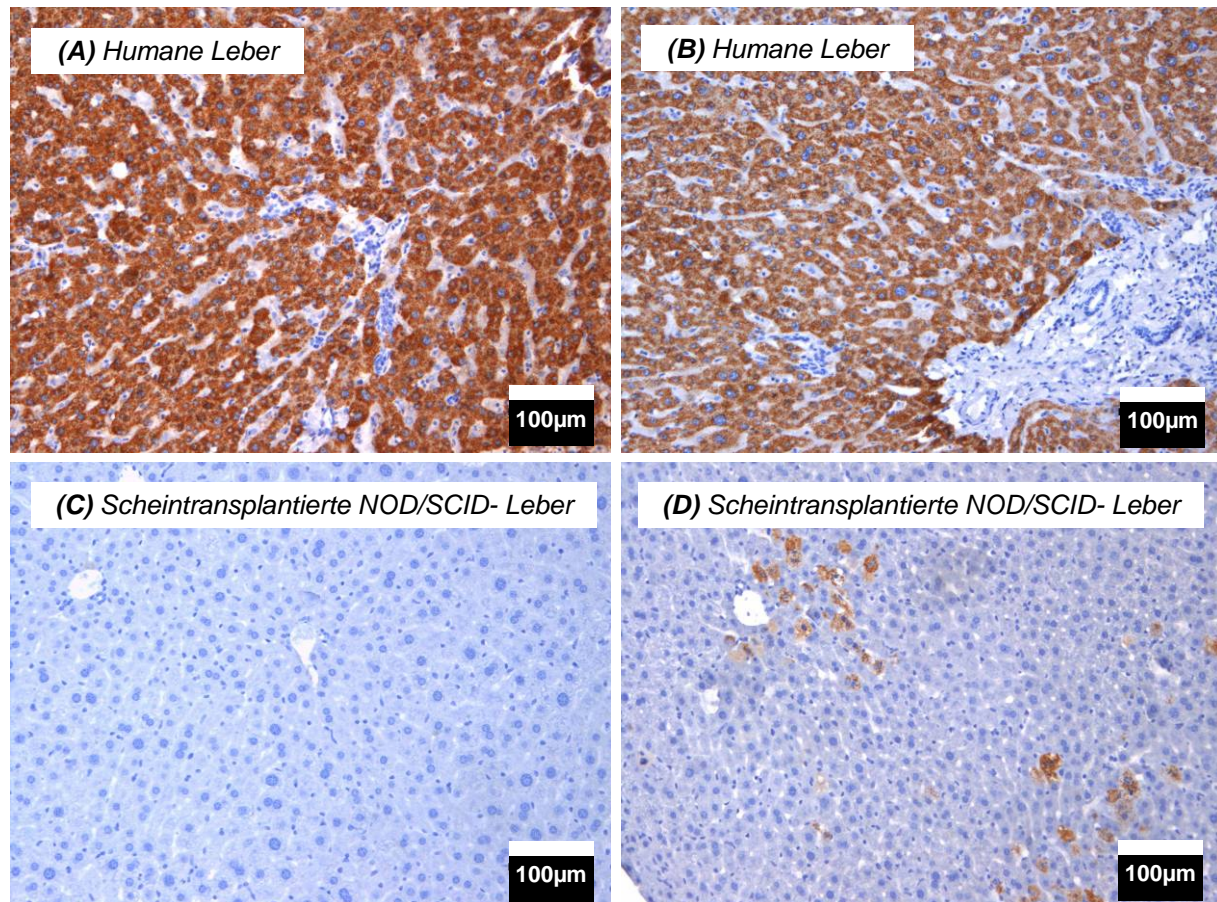


Abbildung 23: (A,B) Humane Lebern als HepPar-Positivkontrolle. (B) HepPar-Antikörper differenziert gut zwischen humanen Hepatozyten und anderen humanen Zelltypen, z.B. Bindegewebe. (C,D) Scheintransplantierte NOD/SCID-Lebern als Negativkontrolle. (C) Negativkontrolle, ohne falsch-positive Zellen, (D) falsch-positive Zelle in scheintransplantierte NOD/SCID-Maus. HepPar-positive Zellen sind braun dargestellt (DAB). Die Gegenfärbung wurde mit Mayers Hämalaun durchgeführt, die Kerne sind hierbei dunkelblau und das Zytoplasma hellblau gefärbt.

Wegen der eingeschränkten Spezifität des HepPar-Antikörpers wurde eine Immunhistochemie hierfür nur an Leberpräparaten durchgeführt, die mit *in vitro* markierten Zellen transplantiert waren. Hierzu wurden 28 Schnitte von mit Qdot655-markierten Nabelschnurblutzellen transplantierten Lebern (Tabelle 6) untersucht. Dabei wurden jeweils vor der Immunhistochemie rotfluoreszierende Nanopartikel gesucht, die entsprechenden Stellen aufgenommen. Nach Durchführung der Immunhistochemie wurden die notierten Stellen auf HepPar-positive Zellen geprüft. Zur Beurteilung, ob Nanopartikel-positive Zellen gleichzeitig

HepPar-positiv sind, wurden die Aufnahmen mittels Bildbearbeitung übereinander gelegt. Bei frühen Transplantationszeitpunkten (4h bis 5d) kam es aufgrund von Entzündungen des Lebergewebes zu Kreuzreaktionen des Antikörpers und damit zu falsch-positiven Signalen.

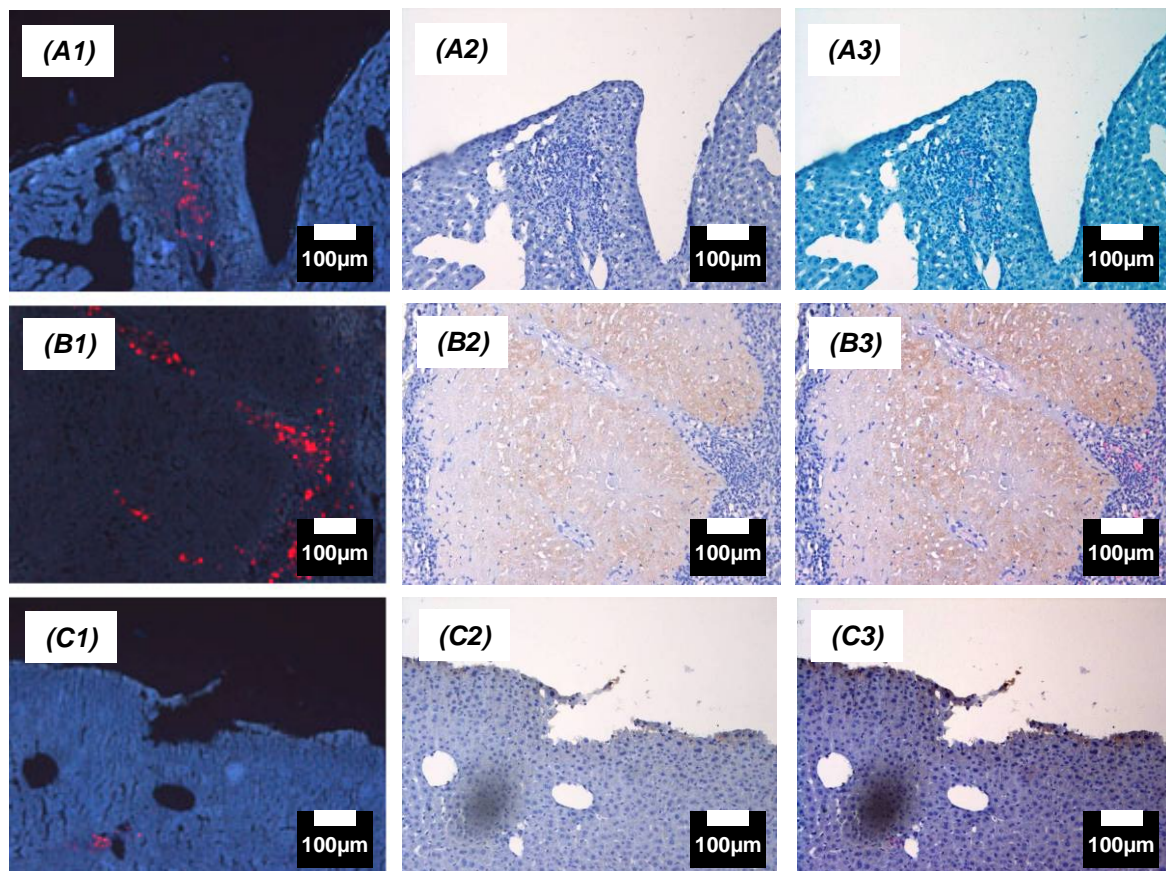


Abbildung 24: (A1,B1,C1) Aufnahmen von Qdot655-positiven Arealen (rot) im transplantierten Gewebe vor Durchführung der HepPar-Immunhistochemie. (A2, B2, C2) Aufnahme der gleichen Stelle nach Durchführung der HepPar-Immunhistochemie und (A3, B3, C3) Übereinanderlagerung der Bilder (A1, A2), (B1, B2) und (C1, C2). Zu erkennen ist, dass die rotfluoreszierenden Qdot-positiven Bereiche nicht mit HepPar-positiven Zellen kolokalisieren. In (B2, B3) sind nekrotische Bereiche im transplantierten Gewebe zu erkennen (blassbraune Farbe, kaum Zellkerne). Nach 21d (C1-C3) sind nur noch sehr wenige Qdot-positive Bereiche im Schnitt.

Bei diesem Verfahren konnten für die 21d-Zeitpunkte keine Zellen gefunden werden, die sowohl Nanopartikel-positiv als auch HepPar-positiv waren (Abbildung 24). Die übereinandergelagerten Bilder des 5d-Zeitpunkts zeigen die Angrenzung der Nanopartikel an nekrotisches Gewebe (Abbildung 24B1-B3). Aufgrund der problematischen Spezifität wurde dieser Antikörper für weitere Versuche nicht eingesetzt.

4.3 Histologische Standardfärbungen

Mithilfe histologischer Standardfärbungen wurden einige mit Stammzellen transplantierte Lebern untersucht. Ziel war es hierbei, exemplarisch leicht zugängliche Funktionen in den mit Stammzellen transplantierten Lebern zu zeigen.

4.3.1 Glykogennachweis durch die PAS-Reaktion

Glykogen wurde in den transplantierten Geweben mit der PAS-Reaktion nachgewiesen. Hierzu wurden von jedem transplantierten Zelltyp Lebern gefärbt, die 21d nach Transplantation präpariert wurden. Charakteristisch ist hierbei die Ausdehnung und Form der PAS-positiven Areale (Abbildung 25), die in Form und Ausdehnung denen der Albumin-Immunhistochemie entspricht. Diese Strukturen wurden nur in transplantiertem und nicht in scheintransplantiertem Gewebe gefunden.

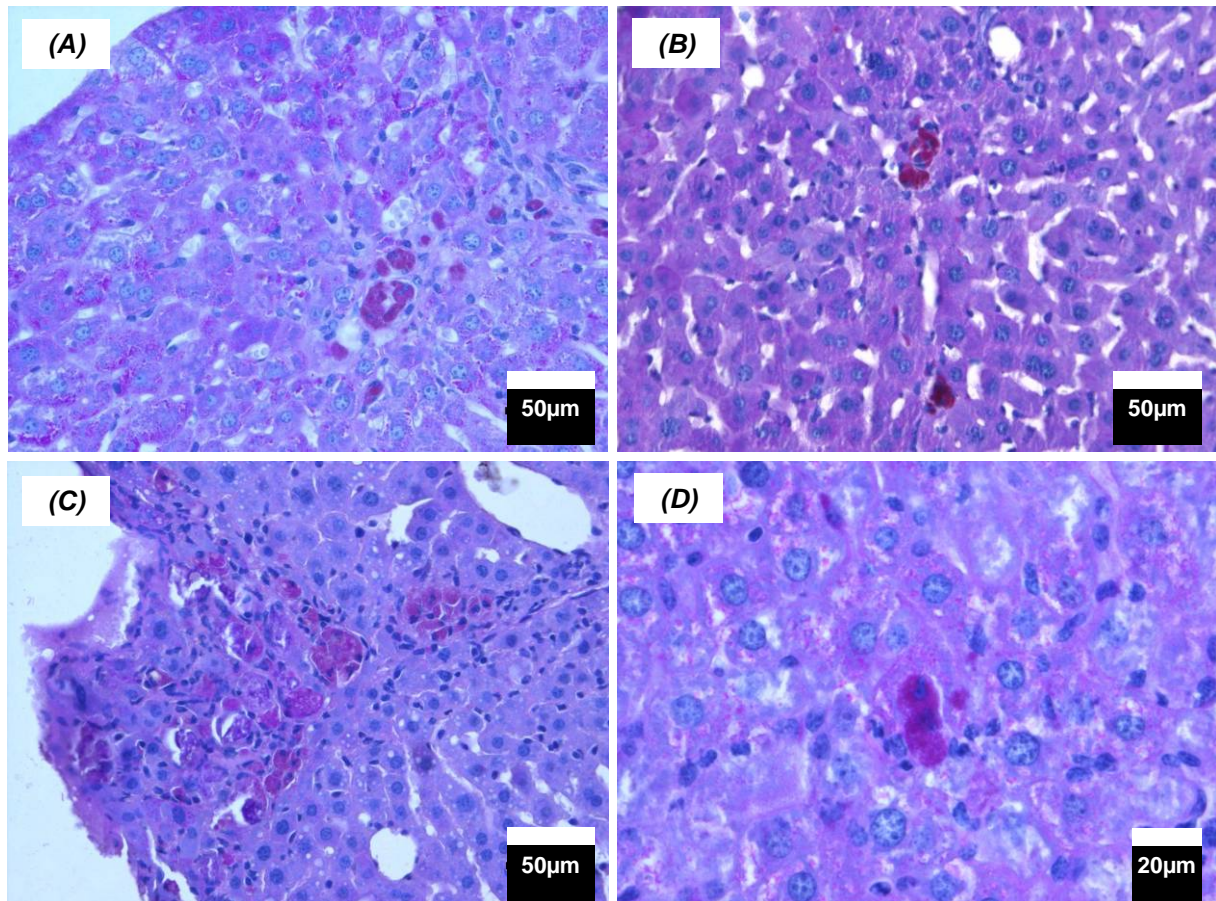


Abbildung 25: PAS-Färbung der Leber von NOD/SCID-Mäusen 21d nach Transplantation von Stammzellen. (A) adhärent proliferierende Nabelschnurblutzellen, (B) Neohepatozyten, (C) immortalisierte und (D) native hepatopankreatische Vorläuferzellen. PAS-positive Bereiche sind an der violetten Färbung zu erkennen.

4.3.2 Eisennachweis durch Berliner-Blau-Reaktion

Mittels der Berliner-Blau-Reaktion wurden Schnitte von Lebern aller transplantierten Zelltypen 21d nach Transplantation auf Eisenspeicherung untersucht. Hierbei wurden Eisenpositive Bereiche gefunden (Abbildung 26). Größe und Ausdehnung der eisenspeichernden Zellen entspricht den in der PAS-Färbung beobachteten Arealen, sowie morphologisch den in der Albumin-Immunhistochemie gefundenen Typ II-Zellen.

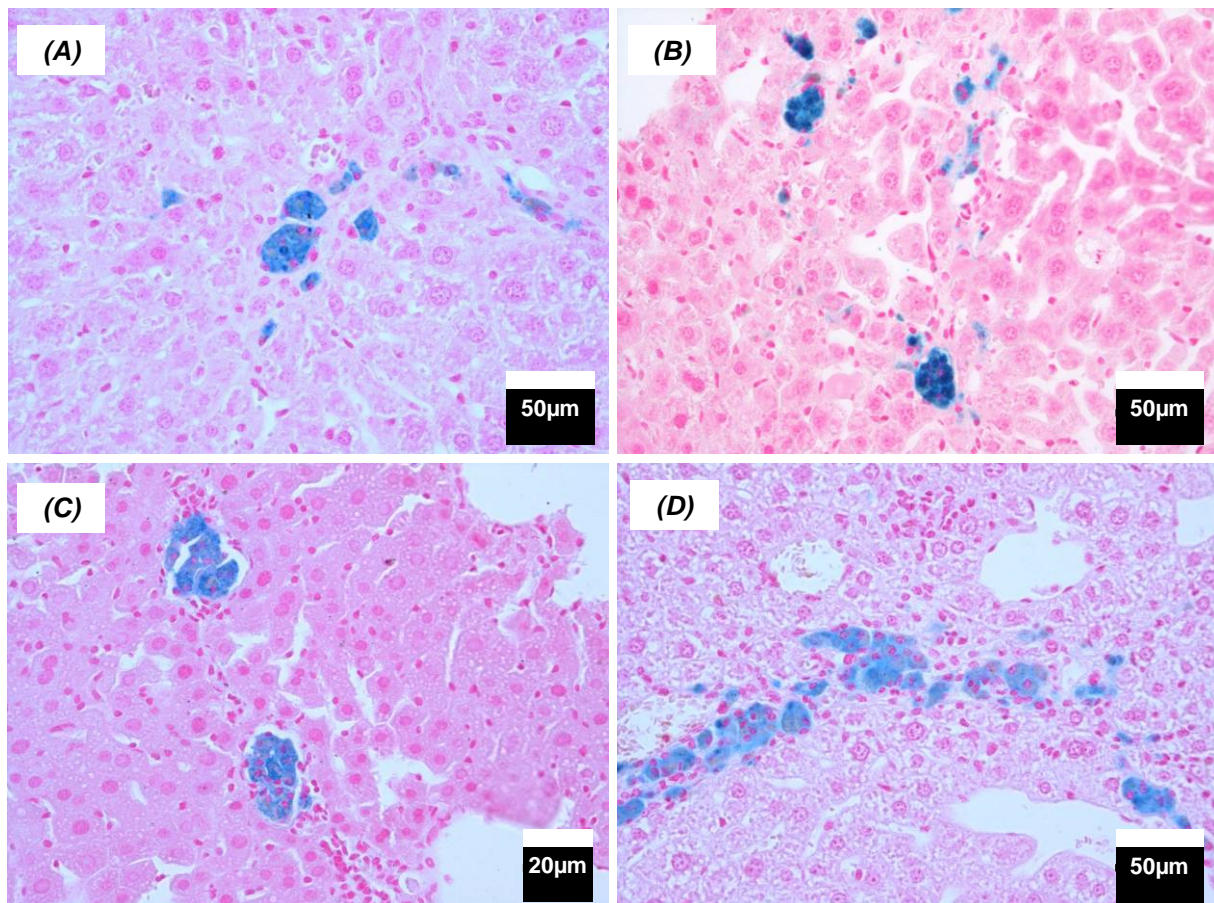


Abbildung 26: Eisennachweis mittels Berliner-Blau-Reaktion der Leber von NOD/SCID-Mäusen 21d nach Transplantation von Stammzellen. (A) adhärent proliferierende Nabelschnurblutzellen, (B) Neohepatozyten, (C) immortalisierte und (D) native hepatopankreatische Vorläuferzellen. Eisen-positive Bereiche sind tiefblau. Die Gegenfärbung wurde mit Kernechtrot durchgeführt.

4.4 Untersuchung auf Zellen humanen Ursprungs

In dem vorangegangenen Kapitel wurden human Albumin-positive Strukturen nach Transplantation verschiedener Stammzelltypen detektiert. Hierbei wurden zwei verschiedene Typen (Typ I und Typ II) immunhistochemisch positiver Zellen beschrieben. Daher sollte nun beurteilt werden, ob die human Albumin-positiven Zellen einen Menschenkern tragen. Dazu wurde die Technik der *in situ* Hybridisierung mit *Alu*-Sonden zur Detektion humaner Kerne sowie Mouse-major-satellite-Sonden zur Detektion von Mauskernen angewendet. Zusätzlich wurde untersucht, ob die CM-DiI-positiven Areale mit *Alu*-Regionen korrelieren und ob so vor der Auswertung eine Abschätzung getroffen werden kann, ob hier humane Kerne zu erwarten sind.

4.4.1 Speziesspezifität und Sensitivität

Zunächst wurde die *in situ* Hybridisierung an humanem Lebergewebe sowie scheintransplantiertem Mauslebergewebe etabliert. Hierzu wurden beide Sonden in einem Hybridisierungsansatz verwendet, um die Spezifität der verwendeten Sonden zu zeigen. Stets durchgeführt wurde auch eine Kernfärbung mit DAPI, zur Überprüfung, ob - wie zu erwarten - eine

Kolokalisation mit den *Alu*-positiven Kernen vorlag. Abbildung 27 verdeutlicht die Spezifität der verwendeten Sonden.

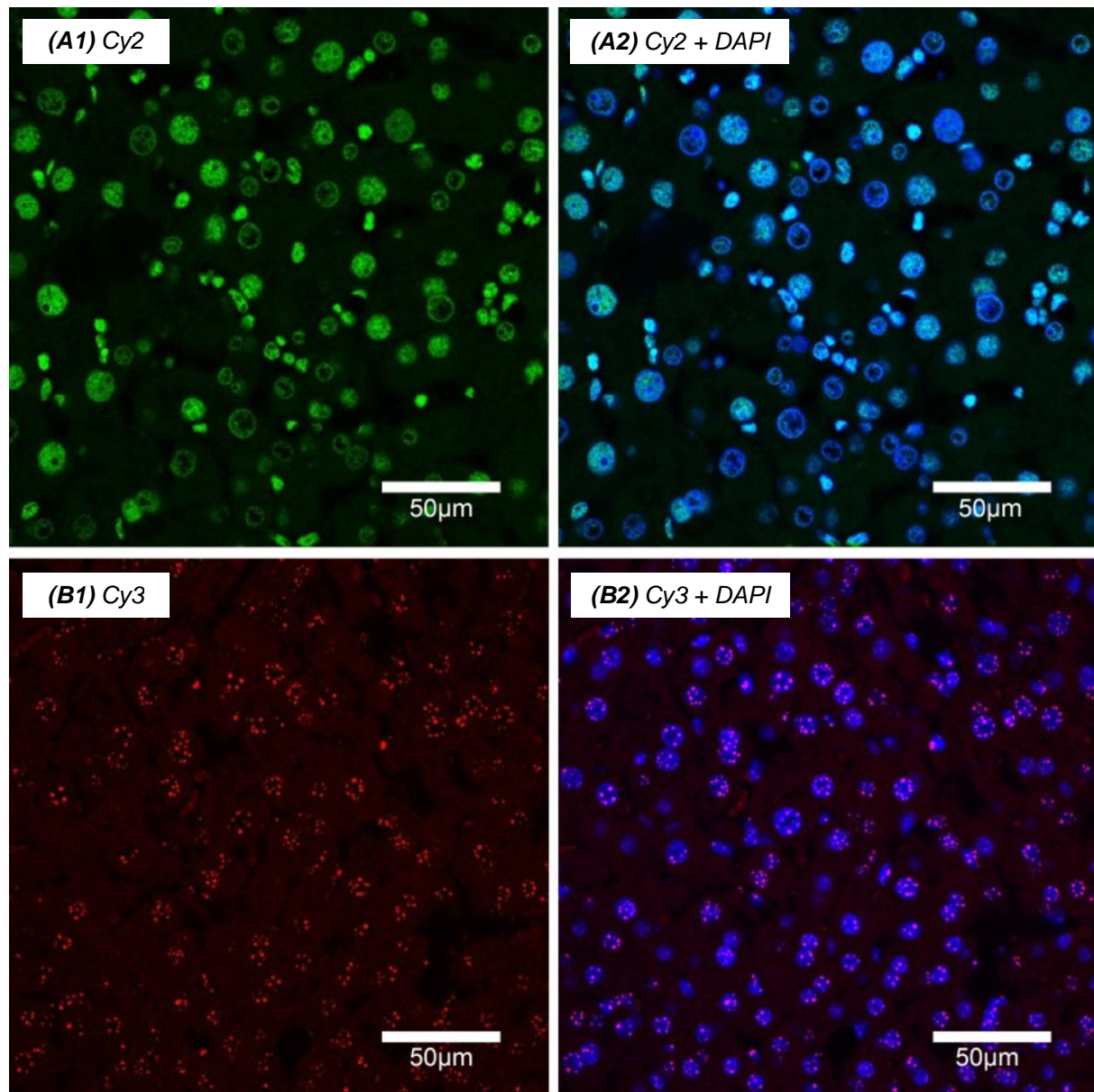


Abbildung 27: *In situ* Hybridisierung mit Sonden für *Alu*-Sequenzen an humanem Lebergewebe (A1, A2) und mit Sonden für Mouse-major-satellite-DNA an murinem Lebergewebe (B1, B2). Cy2-gekoppeltes Nachweissystem für *Alu*-positive Kerne (A1), Cy3-gekoppeltes Nachweissystem für Mouse-major-satellite-DNA (B1). Die Kolokalisation der positiven Sondensignale mit Kernstrukturen ist durch eine DAPI-Färbung der Kerne bestätigt (A2, B2).

4.4.2 Transplantation humaner Primärhepatozyten als Positivkontrolle

Im folgenden Experiment sollte untersucht werden, ob auch in Mauslebergewebe *Alu*-positive Kerne nach Transplantation humaner Hepatozyten nachgewiesen werden können. Hierzu wurden mit 750.000 primären humanen Hepatozyten transplantierte NOD/SCID-Lebern untersucht. Abbildung 28 zeigt einige *Alu*-positive Kerne in transplantiertem Mausgewebe. Gut zu erkennen ist die türkise Mischfarbe, die bei Überlagerung der

Aufnahmen von DAPI-Kernen mit *Alu*-positiven Kernen entsteht und somit die erwartete Kollokalisation zeigt.

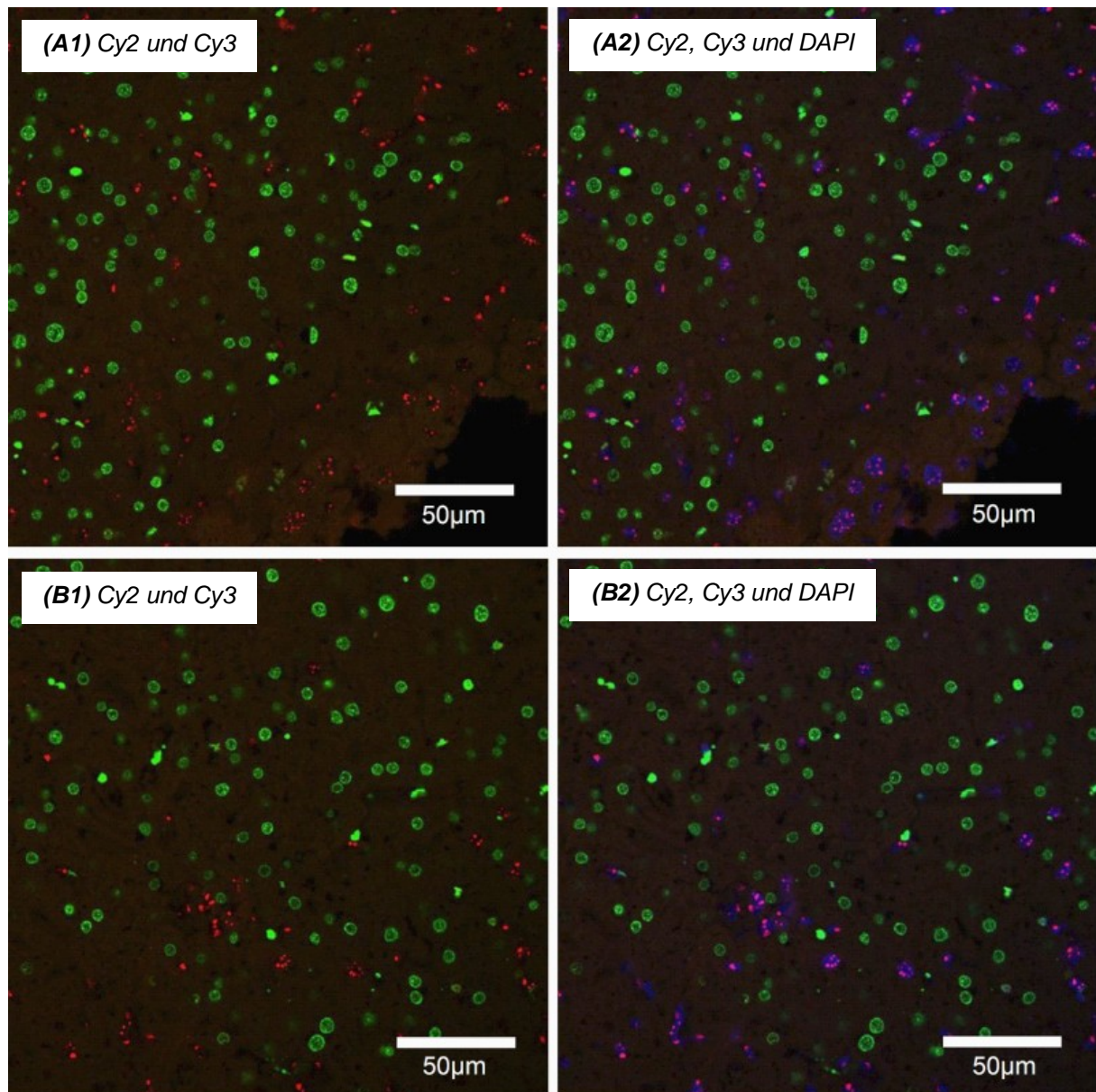


Abbildung 28: *In situ* Hybridisierung auf Gewebeschnitten. In das Leberparenchym immundefizienter NOD/SCID-Mäuse wurden 750.000 humane Primärhepatozyten transplantiert. *Alu*-positive Kerne sind grün (Cy2-gekoppelte Detektion), Mouse-major-satellite-positive DNA ist rot dargestellt (Cy3-gekoppelte Detektion). Die Kernfärbung wurde mit DAPI (blau) durchgeführt.

4.4.3 *In situ* Hybridisierung nach Transplantation adhärent proliferierender Nabelschnurblutzellen

Nach Transplantation ins Versuchstier wurden *in vitro* mit CM-DiI markierte Nabelschnurblutzellen in Gewebeschnitten anhand der charakteristischen Rotfluoreszenz gefunden. Ferner wurden immunhistochemisch zwei Typen human Albumin-positiver Zellen nachgewiesen. Mithilfe der Technik der *in situ* Hybridisierung wurde untersucht, ob CM-DiI-positive Areale gleichzeitig auch *Alu*-positiv sind. Die Identität der der zwei unterschiedlichen Typen human Albumin-positiver Zellen wurde durch eine Kombination aus Immunhistochemie und

in situ Hybridisierung mit Sonden gegen *Alu*-Sequenzen und Mouse-major-satellite-DNA durchgeführt.

4.4.3.1 *Alu*-positive Kerne zu verschiedenen Explantationszeitpunkten

Mit diesem Experiment sollte festgestellt werden, ob nach Transplantation von Nabelschnurblutzellen *Alu*-positive Kerne in der Mausleber nachgewiesen werden können. Hierzu wurden Lebern von jeweils drei NOD/SCID-Mäusen zu den Zeitpunkten 4h, 12h, 24h, 5d und 21d nach Transplantation untersucht. In das Parenchym des linken Leberlappens wurden jeweils 750.000 mit Qdot655-Partikeln vormarkierte Zellen injiziert (vgl. Tabelle 4 und Tabelle 6). Die Anzahl der hierbei gefundenen *Alu*-positiven Kerne stimmt qualitativ gut mit den Ergebnissen der Auszählung der Qdot655-positiven Bereiche überein (vgl. Tabelle 10).

Tabelle 10: Durch Auszählung der Qdot655-Partikel gefundene Strukturen im Vergleich mit *Alu*-positiven Kernen nach *in situ* Hybridisierung an Schnitten des gleichen Transplantationsversuchs.

Zeit zwischen Injektion und Explantation	Qdot655-positive Zellen		<i>Alu</i> -positive Kerne	
	Mittelwert je Schnitt	Σ untersuchter Schnitte	Mittelwert je Schnitt	Σ untersuchter Schnitte
4h	34	6	9,1	8
12h	252,6	6	13,6	9
24h	102,6	6	26,6	10
5d	34,5	4	6,7	7
21d	13,3	6	1,5	15

Auffallend ist, dass die Zahl der Qdot655-positiven Zellen wesentlich höher als die der *Alu*-positiven Kerne ist. Ferner findet der Anstieg *Alu*-positiver Signale erst nach 24h statt, gegenüber dem Anstieg Qdot655-positiver Signale bereits nach 12h. Die Abnahme *Alu*-positiver Kerne wird im Kapitel 5.5 diskutiert.

4.4.3.2 *Alu*-positive Kerne in Relation zu CM-DiI

An ausgewählten Schnitten der mit CM-DiI markierten Zellen transplantierten NOD/SCID-Mäuse (Tabelle 6) wurde eine *in situ* Hybridisierung mit *Alu*-Sonden durchgeführt. Hierzu wurden die Schnitte zunächst in paraffinisiertem Zustand auf rotfluoreszierende Bereiche untersucht. Anschließend wurde die *in situ* Hybridisierung durchgeführt. Darauf folgend wurden die CM-DiI-positiven Stellen mit Filtern für Rot- und Grünfluoreszenz erneut aufgenommen. Hierbei wurden in den CM-DiI-positiven Bereichen *Alu*-positive Kerne nachgewiesen (Abbildung 29). Auffallend ist, dass nur ein Teil der Kerne des CM-DiI-positiven Bereichs *Alu*-positiv sind. Da das Detektionssystem der Mouse-major-satellite-Sonde ebenfalls über rote Fluoreszenz ausgewertet wird, wurde diese Technik hierbei nicht angewandt.

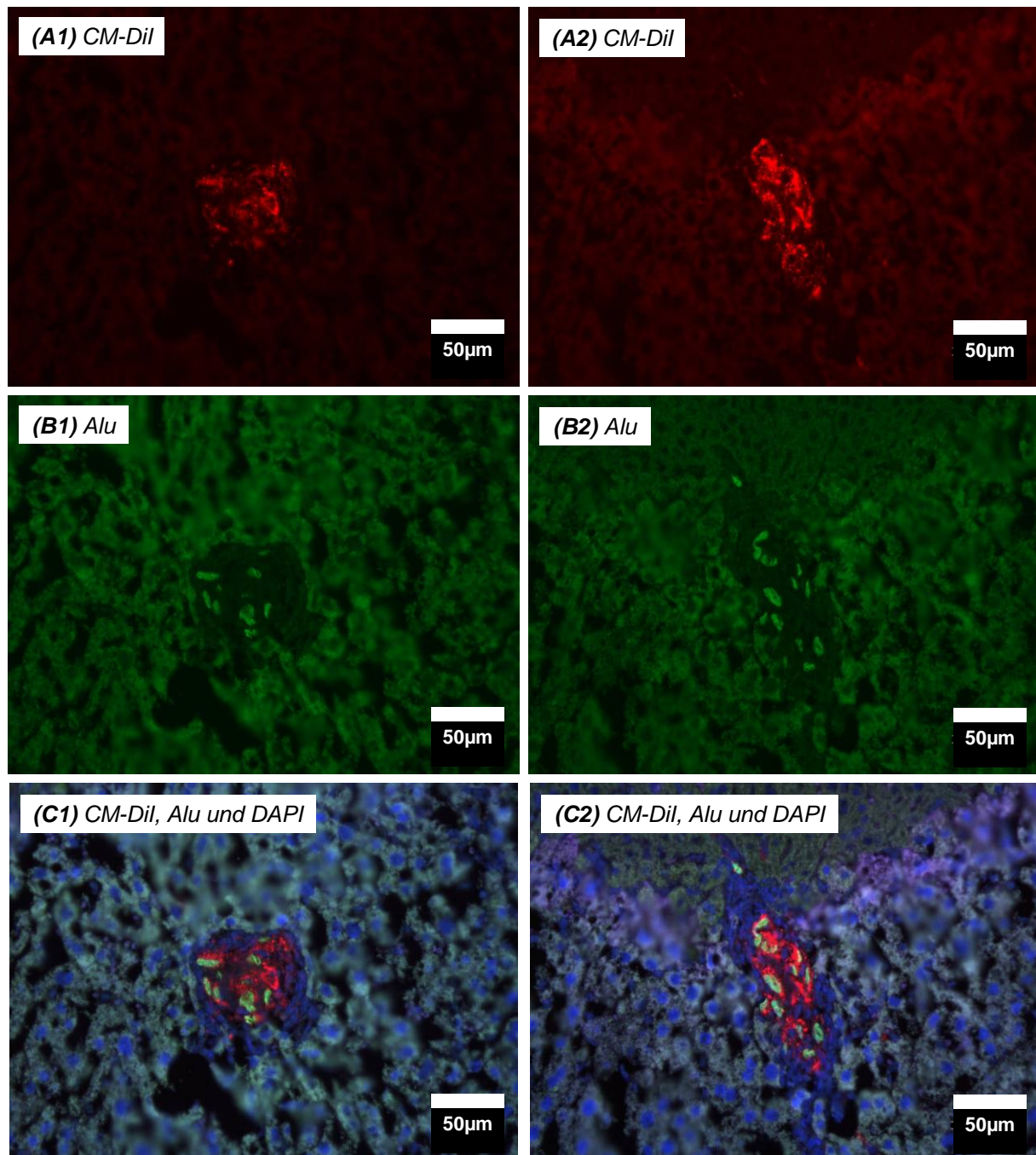


Abbildung 29: In situ Hybridisierung mit Alu-Sonden auf Schnitten, die mit 750.000 CM-DiI-markierten Nabelschnurblutzellen transplantiert wurden. CM-DiI (rot, Cy3), Alu (grün, Cy2), DAPI (Blau, UV).

4.4.3.3 *Alu*-positive Kerne in Relation zu human Albumin-positiven Zellen

In der Immunhistochemie auf humanes Albumin wurden zwei unterschiedliche Typen human Albumin-positiver Zellen gefunden. Um die Identität der Typ I-Zellen zu untersuchen, wurden Präparate gewählt, bei denen in früheren immunhistochemischen Färbungen der Nachweis Albumin-positiver Typ I-Zellen gelungen war. Hierzu wurde an neu angefertigten Schnitten dieser Proben zunächst eine immunhistochemische Färbung humanen Albumins durchgeführt. Direkt im Anschluss daran wurden die gefärbten Schnitte auf human Albumin-positiver Typ I-Zellen untersucht und positive Stellen fotografiert. Daraufhin wurden die

Schnitte mit den Sonden für Mouse-major-satellite-DNA und *Alu*-Sequenzen in einem Ansatz inkubiert. Bei der Auswertung der Schnitte wurden die human Albumin-positiven Stellen erneut mit Filter für Grün- (Cy2) und Rotfluoreszenz (Cy3) aufgenommen. Die so entstandenen Bilder zeigen, dass Typ I-Zellen negativ für *Alu* (Abbildung 30C), aber positiv für Mouse-major-satellite-DNA sind (Abbildung 30B).

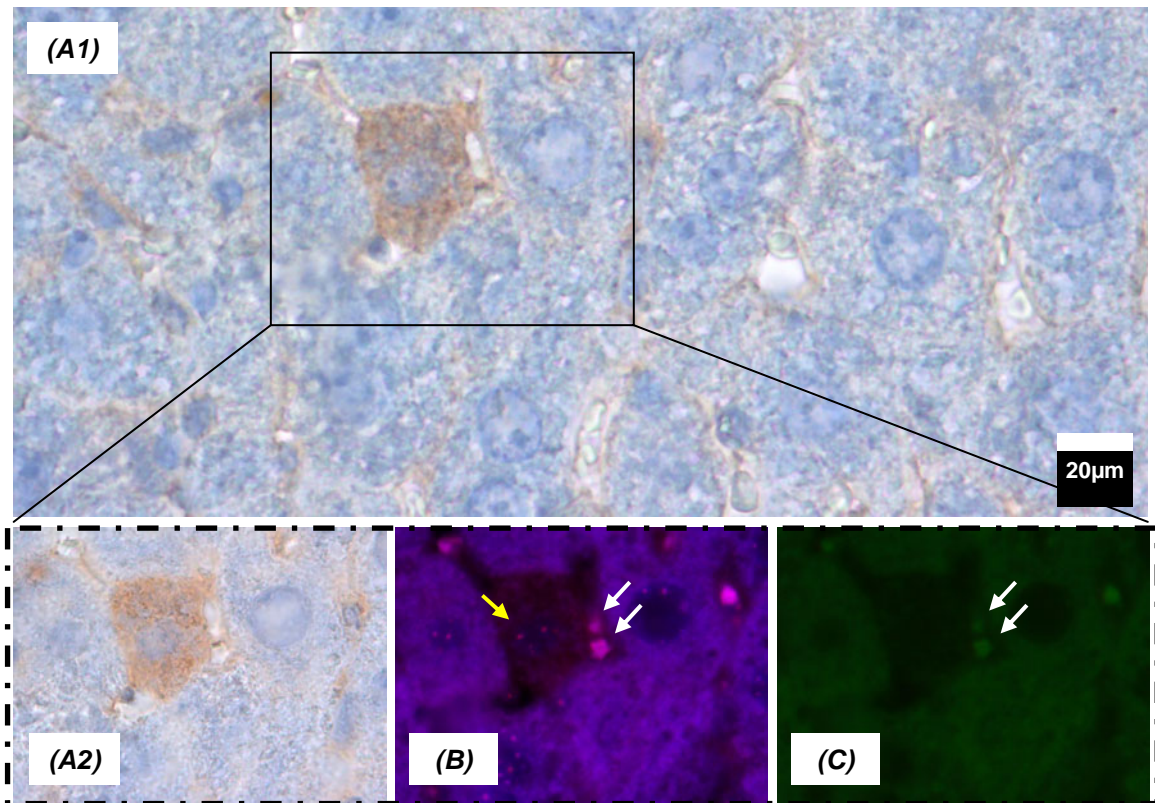


Abbildung 30: Human Albumin-positive Typ I-Zelle in der Immunhistochemie (A1 und A2; DAB, braun). In der anschließenden *in situ* Hybridisierung mit Sonden für *Alu*-Sequenzen (C; Cy2, grün) und Mouse-major-satellite-DNA (B; Cy3 rot) wurde für die Albumin-positive Typ I-Zelle ein Mauskern (B) gefunden (gelber Pfeil). Gegenfärbung mit Mayers Hämalaun (A1 und A2; blau), Kernfärbung mit DAPI (B; blau). Die weißen Pfeile kennzeichnen Erythrozyten, die aufgrund ihres hohen Eisengehaltes eine Autofluoreszenz im roten und grünen Bereich besitzen.

Die Frage der Identität der Typ II-Zellen wurde anhand von Schnitten untersucht, die CM-DiI-positive Bereiche enthielten. Hier wurde zunächst eine Immunhistochemie auf humanes Albumin durchgeführt, daran anschließend eine *in situ* Hybridisierung mit *Alu*-Sonden. Sonden gegen Mouse-major-satellite-DNA wurden wegen der zu CM-DiI ähnlichen Detektion nicht verwendet. In der mikroskopischen Auswertung konnten in den human Albumin-positiven Bereichen, die gleichzeitig auch CM-DiI-positiv waren, einige Zellen mit *Alu*-positiven Kernen gefunden werden (Abbildung 31C und D). Allerdings sind nicht alle Kerne der Typ II-Zellen auch gleichzeitig *Alu*-positiv.

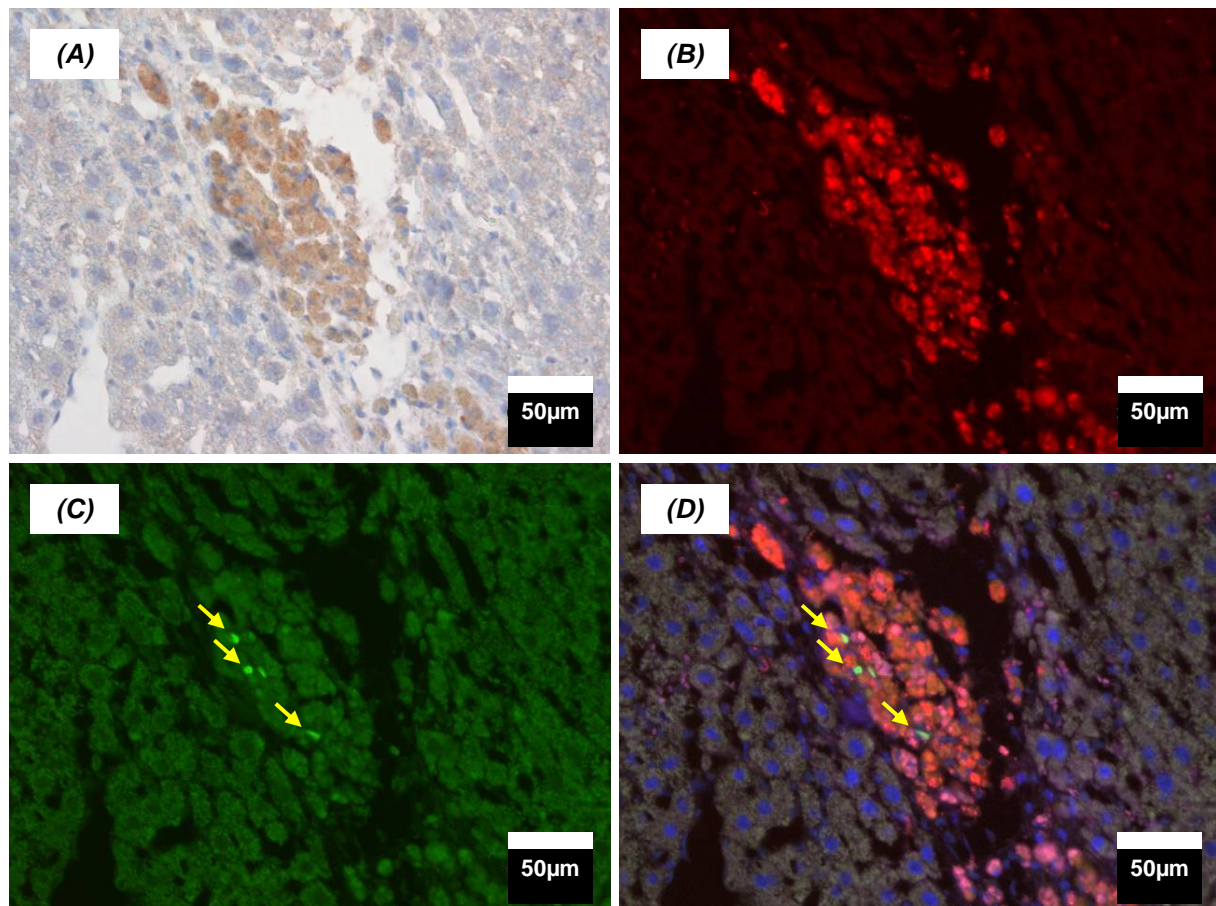


Abbildung 31: Human Albumin-positive Typ II-Zellen in der Immunhistochemie (A; DAB, braun). Typ II-Zellen sind durch Markierung mit CM-Dil rotfluoreszierend (B; Cy3, rot). In der anschließenden *in situ* Hybridisierung mit *Alu*-Sonden (C; Cy2, grün) wurde für die Albumin-positiven Typ II-Zellen *Alu*-positive Kerne gefunden (C, gelbe Pfeile). In (D) ist zu erkennen, dass die *Alu*-positiven Kerne (gelbe Pfeile) gut mit dem CM-Dil-positiven Bereich (B) korrelieren. Gegenfärbung mit Mayers Hämalaun (A; blau), Kernfärbung mit DAPI (D; blau).

4.5 Quantifizierung menschlicher DNA in der Mausleber (nach der Transplantation von Nabelschnurblutzellen)

In den vorigen Kapiteln wurden mittels Immunhistochemie und *in situ* Hybridisierung sowohl Zellen mit Expression menschlichen Albumins als auch Zellen *Alu*-Sequenzen in der Mausleber nachgewiesen. Daher sollte eine Quantifizierung menschlicher DNA in der Mausleber erfolgen. Hierzu wurden jeweils 750.000 Nabelschnurblutzellen in den linken Leberlappen von NOD/SCID-Mäusen transplantiert und diese nach 4h, 12h, 24h, 5d und 21d präpariert. Nach Isolierung der DNA erfolgte die Duplex-PCR auf α -satellite-repeats des humanen Chromosoms 7 und auf die repeat-Sequenz des Mausechromosoms 8. Diese Technik ermöglicht die Abschätzung des Anteils menschlicher DNA im Mausgewebe. War der Anteil der menschlichen DNA im Mausgewebe unterhalb der Bestimmungsgrenze der Duplex-PCR, wurde die PCR erneut nur mit humanen Primern gegen die α -satellite-repeats des humanen Chromosoms 7 durchgeführt. In der Duplex-PCR ergab sich ein Anteil menschlicher DNA zwischen 0,01 und 0,75% (Tabelle 11).

Tabelle 11: Anteil humaner DNA in Mausleber zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transplantation

Zeit nach Transplantation		Anteil humaner DNA	
		in Duplex-PCR	in PCR mit humanen Primern
4h	Maus 1	nicht nachweisbar	nicht durchgeführt
	Maus 2	0,25 - 0,5%	nicht durchgeführt
	Maus 3	0,01 - 0,1%	nicht durchgeführt
12h	Maus 1	nicht nachweisbar	nicht durchgeführt
	Maus 2	0,1 - 0,25%	nicht durchgeführt
	Maus 3	0,5 - 0,75%	nicht durchgeführt
24h	Maus 1	nicht nachweisbar	nicht durchgeführt
	Maus 2	0,01 - 0,1%	nicht durchgeführt
	Maus 3	nicht nachweisbar	nicht durchgeführt
	Maus 4	0,25 - 0,5%	nicht durchgeführt
5d	Maus 1	0,01 - 0,1%	nicht durchgeführt
	Maus 2	0,1 - 0,25%	nicht durchgeführt
21d	Maus 1	nicht nachweisbar	0,001% - 0,01%
	Maus 2	nicht nachweisbar	nicht nachweisbar
	Maus 3	nicht nachweisbar	0,001% - 0,01%
	Maus 4	nicht nachweisbar	0,001% - 0,01%
	Maus 5	nicht nachweisbar	0,001% - 0,01%
	Maus 6	nicht nachweisbar	0,001% - 0,01%
	Maus 7	nicht nachweisbar	nicht nachweisbar
Scheintrans- plantierte Kontrollen	Maus 1	nicht nachweisbar	nicht nachweisbar
	Maus 2	nicht nachweisbar	nicht nachweisbar
	Maus 3	nicht nachweisbar	nicht nachweisbar
	Maus 4	nicht nachweisbar	nicht durchgeführt

4h nach Transplantation lag der Anteil humaner DNA im Mausgewebe bei 0,01-0,5%, nach 12h bei 0,1-0,75%, nach 24h bei 0,01-0,5% und 5d nach Transplantation bei 0,01-0,25%. Zwischen Tag 5 und Tag 21 nach Transplantation war dann eine deutliche Abnahme zu beobachten (Tabelle 11). Menschliche DNA war noch in 5 von 7 transplantierten Lebern nachweisbar. In diesen Geweben lag der Anteil humaner DNA zwischen 0,001 und 0,01%. Bei Berücksichtigung aller Zeitpunkte konnte in fünf von 19 der mit Nabelschnurblutzellen transplantierten Mäuse keine menschliche DNA nachgewiesen werden. Da zu den frühen Zeitpunkten (4h, 12h und 24h) der Anteil der humanen DNA bei allen anderen Proben relativ hoch war, könnte dies dadurch bedingt sein, dass nur kleine Leberstücke (1mm³) für die DNA-Isolierung herangezogen wurden und die Verteilung der transplantierten Zellen über den Leberlappen heterogen sein kann. Da der Anteil der humanen DNA im Mausgewebe bis

zum 21. Tag stark abgenommen hat, könnte das negative Ergebnis bei zwei der 21d-Mäuse zusätzlich dadurch bedingt sein, dass die Menge der menschlichen DNA unterhalb der Bestimmungsgrenze lag. In allen mitgeführten scheintransplantierten Kontrolllebern konnte keine menschliche DNA im Gewebe gefunden werden (unterhalb der Nachweisgrenze von 0,001%). Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass zu allen untersuchten Zeitpunkten zwischen 4h und 3 Wochen nach der Transplantation menschliche DNA nachweisbar war.

4.6 Intron-PCR zum Nachweis humaner DNA

Mithilfe dieser Technik sollte untersucht werden, ob speziesspezifisch genomische humane DNA nach der Transplantation von Stammzellen in Mauslebergewebe nachgewiesen werden kann. Hierzu wurde genomische DNA aus den Explantaten isoliert und anschließend mittels PCR untersucht. Um humanes Albumin spezifisch detektieren zu können, wurde Intron-DNA humanen Albumins amplifiziert.

4.6.1 Serielle Verdünnungsreihe zum Abschätzen der Sensitivität

Um abschätzen zu können, wie sensitiv humane DNA in Maus-Gewebe wiedergefunden werden kann, wurde eine serielle Verdünnungsreihe von Mensch-in-Maus-DNA hergestellt. Hierzu wurde genomische Mensch-DNA (Konzentration: 400µg/mL) seriell mit genomischer Maus-DNA (Konzentration: 400µg/mL) im Verhältnis 1:10 verdünnt (Tabelle 4). Da der erwartete Anteil menschlicher DNA sehr niedrig ist (vgl. 0), wurde die Verdünnungsreihe bis hin zu einer Konzentration von 0,0004µg humaner DNA/mL angesetzt.

Tabelle 12: Konzentrationen und Verdünnungsfaktoren der Proben in der seriellen Verdünnungsreihe genomischer Mensch-DNA in genomischer Maus-DNA.

Probenbezeichnung	c ₀ Mensch	c ₀ Maus	c ₁	c ₂	c ₃	c ₄	c ₅	c ₆
Verdünnungsfaktor	1:1	1:1	1:10 (10 ⁻¹)	1:100 (10 ⁻²)	1:1000 (10 ⁻³)	1:10000 (10 ⁻⁴)	1:100000 (10 ⁻⁵)	1:1000000 (10 ⁻⁶)
Konzentration humaner DNA [µg/mL]	400	0	40	4	0,4	0,04	0,004	0,0004

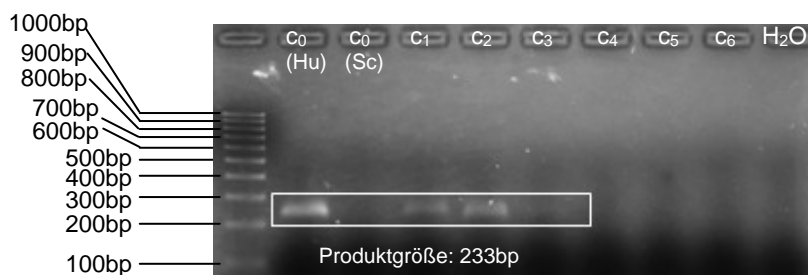


Abbildung 32: Agarose/Ethidiumbromid-Gel der seriellen Verdünnungsreihe von genomischer Mensch-DNA in genomischer Maus-DNA (c₁ bis c₆) mit positiven Produktbänden (233bp) bei c₁ und c₂, sowie schwach positiv bei c₃. Als Positivkontrolle ist in c₀ (Hu) humane genomische DNA, sowie als Negativkontrolle in c₀ (Sc) genomische Maus-DNA aufgetragen. Die negative H₂O-Kontrolle zeigt, dass die verwendeten Reagenzien nicht kontaminiert waren.

In Abbildung 32 wurde ein Agarose/Ethidiumbromid-Gel der seriellen Verdünnungsreihe aufgenommen. Die mitgeführte Positivkontrolle, sowie die Lanes der c_1 - und c_2 -Verdünnung haben eine Produktbande bei 233bp (entsprechend der Produktgröße des amplifizierten Fragments). Eine schwache Bande ist noch für c_3 zu erkennen. Keine Banden wurden gefunden für die Negativkontrolle (reine genomische Maus-DNA), die Wasserkontrolle (Lane H_2O), sowie für die Verdünnungsstufen c_4 bis c_6 . Mithilfe dieser Methode wurde bis zu einer Konzentration von $0,4\mu\text{g/mL}$ (entsprechend einer Verdünnung von 1 Teil Mensch-DNA in 1000 Teilen Maus-DNA) nachgewiesen.

4.6.2 Intron-PCR mit genomischer DNA isoliert aus mit adhärent proliferierenden Nabelschnurblutzellen transplantierten Mausebern

Mithilfe der Intron-PCR-Technik zur Detektion humanen Albumins in transplantiertem Gewebe wurden mit Nabelschnurblutzellen transplantierte Lebern untersucht. Hierzu wurde zunächst genomische DNA isoliert und mit Primern spezifisch für ein Albumin-Intron humaner DNA amplifiziert. In diesem Experiment wurden 76 verschiedene mit 150.000, bzw. 750.000 Nabelschnurblutstammzellen transplantierte Mausebern untersucht. Insgesamt konnte in 4 transplantierten Geweben das gesuchte Produkt nachgewiesen werden (entsprechend 5,2% der untersuchten Proben). Drei der vier positiven Banden wurden hierbei in Mäusen gefunden, die 21d nach Transplantation präpariert wurden. Ein positives Signal wurde darüber hinaus bei einer Leber gefunden, die 1d nach Transplantation explantiert wurde. Da genomische DNA nur aus einem kleinen Stück des Lebergewebes isoliert wurde, können die negativen Ergebnisse eines großen Teils der untersuchten Proben damit begründet werden. Limitierend ist zudem die Nachweisempfindlichkeit der verwendeten Methode.

4.6.3 Intron-PCR mit genomischer DNA isoliert aus Mausebern, die mit weiteren Zelltypen transplantiert wurden

Neben adhärent proliferierenden Nabelschnurblutzellen wurden auch Stamm- und Vorläuferzellen anderen Ursprungs in den linken Leberlappen von immundefizienten Mäusen transplantiert. Die genomische DNA dreier Mäuse, die jeweils 750.000 immortalisierte hepatopankreatische Vorläuferzellen für 21d transplantiert bekamen, wurden mit der Intron-PCR-Technik untersucht. Außerdem wurde genomische DNA aus den injizierten Leberlappen von 20 NOD/SCID-Mäusen, 21d nach Transplantation von 750.000 Neohepatozyten (9) oder PCMOs (11) (vgl. 3.1.2). Um zu überprüfen, ob auch nach 2 Monaten noch humanes Albumin in der isolierten genomischen DNA gefunden werden kann, wurde DNA aus den Lebern von 6 NOD/SCID-Mäusen isoliert. Diese Gruppe bekam 750.000 Neohepatozyten direkt in den linken Leberlappen injiziert. Die Explantation der Lebern erfolgte nach 2 Monaten. Mit der verwendeten Technik wurde allerdings in keiner der untersuchten Proben das PCR-Produkt

nachgewiesen. Gründe hierfür liegen wahrscheinlich wiederum in der niedrigen Konzentration humaner genomischer DNA im transplantierten Gewebe und der statistischen Verteilung der Zellen Gewebe.

4.7 *In vitro* Untersuchungen

4.7.1 Phase I-Metabolismus der Neohepatozyten

An ausgewählten Parametern wurde verglichen, wie sich *in vitro* differenzierte Neohepatozyten im Vergleich zu primären humanen Hepatozyten verhalten. Hierzu wurde die EROD-Aktivität als Maß für die CYP1A-Aktivität des Phase I-Metabolismus untersucht.

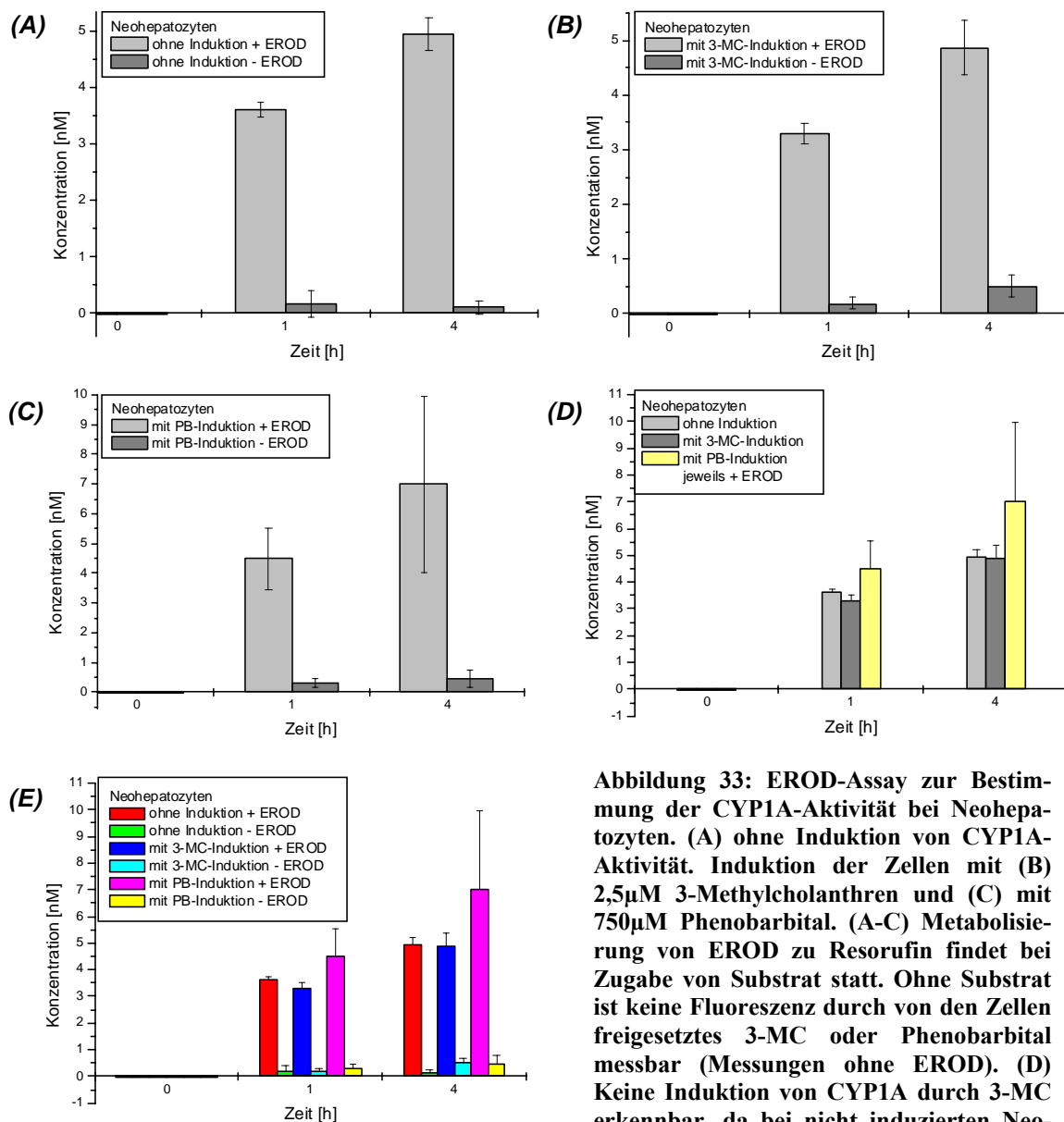


Abbildung 33: EROD-Assay zur Bestimmung der CYP1A-Aktivität bei Neohepatozyten. (A) ohne Induktion von CYP1A-Aktivität. Induktion der Zellen mit (B) 2,5 μ M 3-Methylcholanthren und (C) mit 750 μ M Phenobarbital. (A-C) Metabolisierung von EROD zu Resorufin findet bei Zugabe von Substrat statt. Ohne Substrat ist keine Fluoreszenz durch von den Zellen freigesetztes 3-MC oder Phenobarbital messbar (Messungen ohne EROD). (D) Keine Induktion von CYP1A durch 3-MC erkennbar, da bei nicht induzierten Neohepatozyten und mit Phenobarbital-induzierten Hepatozyten vergleichbarer Umsatz stattfindet.

(E) Vergleich aller untersuchter Proben, der verdeutlicht, dass eine zeitabhängige Zunahme der EROD-Metabolisierung in allen Proben gemessen wurde. Ohne Substrat ist keine Fluoreszenz messbar. Die Konzentration an durch CYP1A entstandenes Resorufin ist in nM angegeben.

Dabei wurden sowohl nicht-induzierte als auch durch 3-Methylcholanthren und Phenobarbital induzierte Neohepatozyten miteinander verglichen. Untersucht wurden Neohepatozyten, die aus Buffycoats drei verschiedener Spender gewonnen wurden. Pro Spender wurden jeweils vier 6-Well-Platten angesetzt, so dass für jeden Buffycoat eine Doppelbestimmung durchgeführt wurde. Pro 6-Well-Platte wurden initial 25×10^6 -Zellen ausgesät. Bei allen untersuchten Proben wurde ein deutlicher Umsatz von EROD zu Resorufin beobachtet. Überraschenderweise war der Umsatz bei allen Proben, denen das Substrat zugegeben wurde, vergleichbar (Abbildung 33A-E). Die Induktion der Neohepatozyten mit $2,5 \mu\text{M}$ 3-Methylcholanthren für drei Tage führte nicht zu einer Steigerung der CYP1A-Aktivität, während bei den Kontrollen ohne Substratzugabe erwartungsgemäß kein Anstieg der Fluoreszenz beobachtet wurde (Abbildung 33A-C, E).

5 Diskussion

5.1 Aktuelle Arbeiten zum Schicksal transplantierter Stammzellen in der Leber von Versuchstieren

Für Forschung und therapeutische Anwendungen besteht ein großer Bedarf an humanen Hepatozyten. Sowohl *in vitro* als auch nach Transplantation ins Tiermodell wurde von vielen Arbeitsgruppen das Potential von Stammzellen verschiedener Quellen untersucht. Die Transplantationen wurden meist in immundefiziente Mäuse durchgeführt (Beerheide *et al.* 2002; Danet *et al.* 2002; Newsome *et al.* 2003; Wang *et al.* 2003b; Kollet *et al.* 2003; Kakinuma *et al.* 2003; Ishikawa *et al.* 2003; von Mach *et al.* 2004; Turrini *et al.* 2005; Ruhnke *et al.* 2005c), wenige Gruppen (Kogler *et al.* 2004; Almeida-Porada *et al.* 2004) transplantierten in Schafe. Die in diesen Versuchen erhaltenen Ergebnisse sind trotz unterschiedlicher Stammzellen, Tiermodelle und Applikationswege recht ähnlich (Tabelle 13 und Tabelle 14). Hinsichtlich der Beurteilung der Ergebnisse bestehen Unterschiede. Teilweise wurden einzelne Zellen auch ohne funktional vollständig charakterisiert zu sein, als echte Hepatozyte oder allgemein als Leberzelle bezeichnet (Danet *et al.* 2002; Kakinuma *et al.* 2003). Überwiegend wurden die vorgefundenen Zellen zurückhaltender als Hepatozyten-ähnlich oder als Zelle mit Expression humaner Faktoren benannt. Offene Fragen, ob Transdifferenzierung der transplantierten Stammzellen oder Fusion von Stammzellen mit Maushepatozyten stattgefunden hat, sind für humane Stammzellen noch nicht beantwortet. Zwar wurde anhand des FAH^{-/-}-Modells für murine Stammzellen gezeigt, dass bei Vorliegen geeigneter Bedingungen Fusion auftritt. Ob sich diese Ergebnisse allerdings auf humane Stammzellen übertragen lassen, ist indes unklar. Therapeutisch wären fusionierende Zellen ebenfalls interessant. Sie könnten als Vehikel genutzt werden, um bei monogenetischen Erkrankungen intakte DNA in die kranke Empfängerzelle einzubringen. Selbstverständlich müssten vor der klinischen Anwendung mögliche unerwünschte Wirkungen, wie beispielsweise Tumorigenese, sorgfältig geprüft werden. Bei einem Selektionsvorteil der reparierten Zelle gegenüber den defizienten Zellen könnte auf diesem Wege ein therapeutischer Effekt erzielt werden. Hintergrund der vorliegenden Arbeit war es daher, das Schicksal humaner Stammzellen nach Transplantation in ein immundefizientes Nagermodell zu verfolgen. Offene Fragen, wie die der Identität der nach Transplantation gefundener Zellen, sollte mithilfe einer *in situ* Hybridisierung geklärt werden. Die Expression humaner Faktoren wurde durch immunhistochemische Detektion humanen Albumins nachgewiesen.

Tabelle 13: Vergleich publizierter Ergebnisse nach Transplantation von verschiedener Stammzellen in Mäuse. Die beschriebenen Beobachtungen sind trotz unterschiedlicher Zellen und Versuche ähnlich.

Transplantierte humaner Zelltyp	Menge injizierter Zellen (Ort)	Leberschaden	Beobachtung
Adhärent proliferierende Nabelschnurblutzellen (Beerheide <i>et al.</i> 2002)	2×10^5 (Leberparenchym)	Keine Schädigung	Expression humanen Albumins nach 21d (IHC, RT-PCR), keine Expression von α -Fetoprotein und GATA-4 (RT-PCR)
Lin ⁻ CD38 ⁻ CD34 ⁺ ClqR _p ⁺ und Lin ⁻ CD38 ⁻ CD34 ⁺ ClqR _p ⁺ isoliert aus Nabelschnurblut und Knochenmark (Danet <i>et al.</i> 2002)	500 bis 7×10^4 (Schwanzvene)	Bestrahlung mit 3,75 Gy	Expression des HepPar1-Antigens und c-met 8 bis 10 Wochen nach Transplantation (IHC), humanes Albumin (RT-PCR)
Mischpopulation mononukleärer Zellen aus Nabelschnurblut (Newsome <i>et al.</i> 2003)	50×10^6 (Schwanzvene)	Bestrahlung mit 2,5 Gy	Expression des HepPar1-Antigens 4, 6 und 16 Wochen nach Transplantation (IHC), keine Hinweise auf Zellfusion
CD34 ⁺ oder CD34 ⁺ , CD38 ⁻ , CD7 ⁻ Zellen aus dem Nabelschnurblut (Wang <i>et al.</i> 2003a)	CD34 ⁺ : 2000 CD34 ⁺ , CD38 ⁻ , CD7 ⁻ : 2×10^5 (Schwanzvene)	CCl ₄ und Bestrahlung mit 3 Gy	Expression humanen Albumins (IHC, RT-PCR, WB) 5d und 30d nach Leberschaden, CK19 (RT-PCR), negative Ergebnisse ohne CCl ₄
CD34 ⁺ -Zellen aus Nabelschnurblut und peripherem Blut (Kollet <i>et al.</i> 2003)	2×10^5 (Schwanzvene)	CCl ₄ und Bestrahlung mit 3,75 Gy	Human Albumin-positive Zelle v.a. im Bereich der Gallengänge (IHC, RT-PCR, WB), Neutralisation des SDF1-Rezeptors CXCR4 verhinderte Homing humaner Stammzellen, Injektion von SDF-1 verbesserte das Homing
Adhärent proliferierende Nabelschnurblutzellen (Kakinuma <i>et al.</i> 2003)	10×10^6 Zellen (Portalvene)	2-AAF und Hepatektomie (1/3)	Expression humanen Albumins (IHC, RT-PCR) und des HepPar1-Antigens in der Leber, im Serum humanes Albumin (WB)
CD34 ⁺ oder CD45 ⁺ Zellen aus Nabelschnurblut (Ishikawa <i>et al.</i> 2003)	1×10^5 Zellen (Schwanzvene)	5-Fluorouracil und α -mouse-c-kit	Expression humanen Albumins (RT-PCR), des HepPar1-Antigens (IHC) und humanen Centromeren (FISH)
Nestin-positive hepato-pankreatische adhären proliferierende Zellen (von Mach <i>et al.</i> 2004)	$0,15 \times 10^5$, $1,5 \times 10^5$ und $7,5 \times 10^5$ Zellen (Leberparenchym)	Keine Schädigung	Expression humanen Albumins (IHC, RT-PCR), Expression murinem Albumins nicht kolokalisiert mit humanem Albumin (IHC) 3 und 12 Wochen nach Transplantation; bei Transplantation von $0,15 \times 10^5$ Zellen neg. Ergebnisse
CD34 ⁺ Zellen aus Nabelschnurblut (Turrini <i>et al.</i> 2005)	$3-5 \times 10^5$ Zellen (intrafetal) 15-20 Zellen (Blastocyst)	Keine Schädigung	Expression humanen Albumins, des HepPar1-Antigens, α 1-antitrypsin (IHC, RT-PCR) 1 und 4 Wochen nach Geburt
Aus Blutmonozyten gewonnene Zellen (Ruhnke <i>et al.</i> 2005c)	$7,5 \times 10^5$ Zellen (Leberparenchym)	Keine Schädigung	Expression humanen Albumins (IHC) 3 Wochen nach Transplantation; Expression murinem Albumins nicht kolokalisiert mit humanem Albumin (IHC)
Adhärent proliferierende Zellen aus Nabelschnurblut (Nonome <i>et al.</i> 2005)	5×10^4 Zellen (Schwanzvene)	Fas-Ligand und Bestrahlung mit 1,5 Gy	Expression humanen Albumins und des HepPar1-Antigens (IHC), sowie Albumin, α -Fetoprotein, Glutaminsynthetase und Transferrin (RT-PCR)
Mischpopulation mononukleärer Zellen aus dem Nabelschnurblut (Sharma <i>et al.</i> 2005)	1×10^6 Zellen (Schwanzvene)	Bestrahlung mit 2,5 Gy	Expression humanen Albumins, aber nicht CK18 (IHC, RT-PCR), 4 Wochen nach Induktion des Leberschadens und 8 Wochen nach Transplantation

Tabelle 14: Vergleich publizierter Ergebnisse nach Transplantation von verschiedenen Stammzellen in weitere Tiermodelle. Die beschriebenen Beobachtungen gleichen denen nach Transplantation in Mäuse.

Transplantiert humaner Zelltyp	Menge inji- zierter Zel- len (Ort)	Leberschaden	Tier- modell	Beobachtung
CD34 ⁺ Lin ⁻ CD38 ⁻ Zellen aus Kno- chenmark, Nabel- schnur- und periphe- rem Blut (Almeida- Porada <i>et al.</i> 2004)	1x10 ⁴ Zellen (intrafetal)	Keine Schädi- gung	Schaf	Expression humanen Albu- mins (IHC, ELISA), "hu- man hepatocyte Antigen" (IHC), <i>Alu</i> -Sequenzen (FISH)
Adhärenz proliferie- rende Nabelschnur- blutzellen	1500 Zellen (intrafetal)	Keine Schädi- gung	Schaf	Expression humanen Albu- mins und "hepatocyte speci- fic Antigen" (IHC, WB)
CD34 ⁺ Lin ⁻ Zellen aus Nabelschnurblut (Zeng <i>et al.</i> 2005)	Zellen (intrafetal)	Keine Schädi- gung	Ziege	Expression humanen Se- rumalbumins und hHNF- 3β-mRNA

5.2 Identifikation der transplantierten Zellen

Meilensteine nach der Transplantation menschlicher Stammzellen in ein Tiermodell stellen das Wiederfinden und der Nachweis des humanen Ursprungs der transplantierten Zellen dar. Eine häufige Strategie zur Identifikation der transplantierten Zellen im Gewebe ist die *in vitro* Markierung der Stammzellen mit Fluorochromen. Nach Transplantation können die Fluoreszenz-markierten Zellen im Gewebe anhand der spezifischen Anregungswellenlänge der verwendeten Fluorochrome identifiziert werden. Allerdings können hierbei leicht falsch-positive Aussagen getroffen werden. Sterben Fluoreszenz-markierte Zellen nach der Transplantation ins Gewebe, können deren Fluorochrome auch durch Zellen des Wirts aufgenommen werden. Beim Bewerten der Fluoreszenz sind Wirtszellen, die das Fluorochrom aus sterbenden Zellen aufgenommen haben, nicht von transplantierten Fluoreszenz-markierten Zellen zu unterscheiden. Die eindeutige Identifikation der transplantierten humanen Zellen kann mit *in situ* Hybridisierung auf spezifische repetitive Sequenzen des menschlichen Genoms durchgeführt werden. Wird zur Detektion der hybridisierten Sonden ein anderes Fluorochrom verwendet, kann durch eine Überlagerung der Fluoreszenzaufnahmen von positivem Kern und positiver *in vitro* Markierung eindeutig eine transplantierte humane Zelle identifiziert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Fluorochrome zur *in vitro* Markierung der Zellen vor Transplantation verglichen, Qdot655-Nanopartikel und der Membranfarbstoff CM-DiI. Die durch Phagozytose in die Zellen aufgenommenen Nanopartikel ließen sich nach Transplantation bereits im paraffinisierten Schnitt unter Fluoreszenzanregung deutlich erkennen. Zwei Besonderheiten der Nanopartikel sind, dass diese sich über großen Wellenlängenbereich anregen lassen, wobei die emittierte Wellenlänge gleich bleibt, sowie dass sie auch bei Anregung mit energiereichem UV-Licht nicht ausbleichen. Bei Anregung mit UV-Licht

und Verwendung eines Fluoreszenzfilters für DAPI können die Partikel anhand ihrer stark-leuchtenden Rotfluoreszenz gut im dann bläulich leuchtenden Gewebe detektiert werden. Einschränkung ist allerdings, dass die Fluoreszenz der Nanopartikel die Durchführung der *in situ* Hybridisierung, aber auch der Immunhistochemie, nicht übersteht. Daher kann keine eindeutige Zuordnung der Qdot655-Fluoreszenz zu einem humanen Kern erfolgen.

Der Membranfarbstoff CM-DiI hat gegenüber anderen Membranfarbstoffen den Vorteil, dass er für Formalin-Fixierung und Paraffin-Einbettung verwendet werden kann, ohne ausgewaschen zu werden. Auch mit CM-DiI lassen sich paraffinisierte Schnitte unter dem Fluoreszenzmikroskop auf charakteristische Rotfluoreszenz hin untersuchen. Anders als die Qdot655-Nanopartikel lässt sich der CM-DiI nur mit einem Fluoreszenzfilter für Rotfluoreszenz (Cy3-Filter) anregen. Da eine Anregung mit UV-Licht nicht möglich ist, lässt sich CM-DiI nicht so kontrastiert wie die Nanopartikel beurteilen. Im Gegensatz zu Qdot655-markierten Zellen lassen sich CM-DiI-markierte Zellen auch nach Durchführung einer *in situ* Hybridisierung noch eindeutig an ihrer Fluoreszenz erkennen. Anhand von Schnitten, die beim Scrennen positive CM-DiI-Areale aufwiesen, wurde eine *in situ* Hybridisierung durchgeführt. Dadurch sollte bestimmt werden, ob in den CM-DiI-positiven Arealen Zellen humanen Ursprungs zu finden sind.

Zur Identifikation humaner Kerne wurden in der vorliegenden Arbeit Sonden verwendet, die spezifisch *Alu*-Sequenzen des humanen Genoms erkennen. Die Detektion der hybridisierten Sonden wurde mit einem Cy2-gekoppelten Nachweissystem (Grünfluoreszenz) durchgeführt, zur Darstellung aller Kerne wurde eine DAPI-Färbung (Blafluoreszenz) angewendet. In der Auswertung wurden die rotfluoreszierenden CM-DiI-positiven Areale mit einem Cy3-Filter aufgenommen. Anschließend wurde die gleiche Stelle unter Verwendung eines Filters für Cy2 ausgewertet und aufgenommen. Hierbei wurden grünfluoreszierende Kerne gefunden, die bei Betrachtung der gleichen Stelle mit dem DAPI-Filter blaue Fluoreszenz zeigten. Durch Übereinanderlagerung der entstandenen Fluoreszenzaufnahmen konnte der humane Ursprung der Zellen im CM-DiI-positiven Areal gezeigt werden.

Zwei verschiedene Möglichkeiten der *in vitro* Markierung von Stammzellen vor Transplantation ins Versuchstier wurden miteinander verglichen. Beide sind geeignet, um bereits im paraffinisierten Gewebeschnitt charakteristisch fluoreszierende Bereiche zu detektieren. Um die humane Identität der Zellen in den fluoreszierenden zu bestimmen, war der Membranfarbstoff CM-DiI besser geeignet, da auch nach Durchführung einer *in situ* Hybridisierung mit *Alu*-Sonden die Rotfluoreszenz zu detektieren war. Durch die *in situ* Hybridisierung wurde so gezeigt, dass in den CM-DiI-positiven Arealen Zellen humanen Ursprungs ge-

funden werden können. Mithilfe der CM-DiI-Markierung von Zellen vor Transplantation ist es somit möglich, bereits im paraffinisierten Schnitt Zellareale zu identifizieren, die Zellen humanen Ursprungs enthalten.

5.3 Beobachtung von zwei Typen human Albumin-positiver Zellen

Nach Transplantation von adhärent proliferierenden Nabelschnurblutzellen, hepatopankreatischen Vorläuferzellen und *in vitro* ausdifferenzierten Neohepatozyten wurden in der vorliegenden Arbeit immunhistochemisch zwei Typen human Albumin-positiver Zellen gefunden (Typ I und Typ II). Der seltenere Typ I ist morphologisch echten Hepatozyten ähnlich. Er besitzt einen großen runden Kern sowie eine polygonale Zellform mit klar erkennbaren Zellgrenzen. Von den umgebenden Maushepatozyten sind die human Albumin-positiven Typ I-Zellen morphologisch praktisch nicht zu unterscheiden. Anders als der häufiger auftretende Typ II human Albumin-positiver Zellen kamen die Typ I-Zellen vereinzelt im Gewebe vor, ohne einen Verbund zu bilden. Die kleineren Typ II-Zellen hingegen kamen in Zellverbänden im Gewebe verteilt vor. Von echten Hepatozyten ist der Typ II leicht zu unterscheiden. Sie weisen ein zum Zytoplasma verschobenes Kern-Zytoplasma-Verhältnis auf. Der Kern ist dezentral gelegen, Zellgrenzen sind schwer zu erkennen.

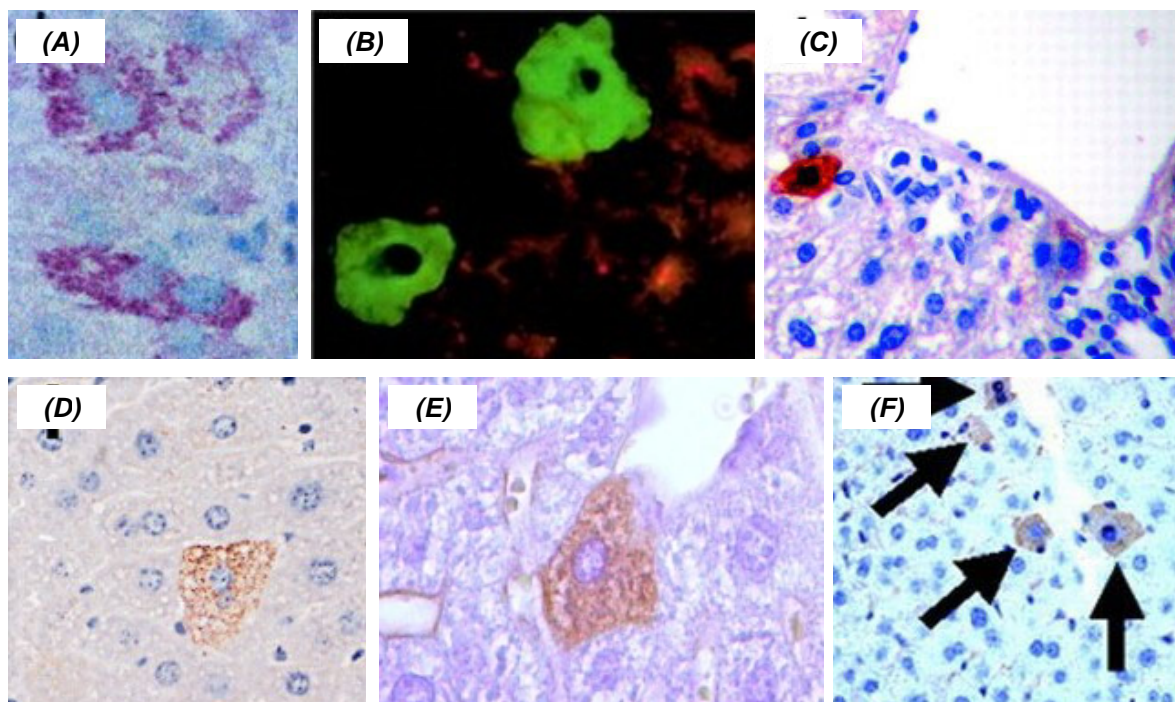


Abbildung 34: Morphologie extrahepatischer Stammzellen nach Transplantation in die Leber immundefizienter Mäuse. Die Bilder sind veröffentlichten Studien entnommen, die immunhistochemisch humanes Albumin (A, B, C, E, F) oder HepPar1 (D) nachgewiesen haben. Transplantiert wurden (A) aufgereinigte $\text{Lin}^- \text{CD38}^- \text{CD34}^{\text{oder}} \text{C1qR}_p^+$ Zellen isoliert aus menschlichem Nabelschnurblut. (Danet *et al.* 2002). Transplantation CD34^+ Zellen aus Nabelschnurblut (B) (Wang *et al.* 2003b) und (C) (Kollet *et al.* 2003). In (D) wurden adhärent proliferierende Nabelschnurblutzellen transplantiert (Kakinuma *et al.* 2003), in (E) Nestin-positive hepatopankreatische Vorläuferzellen (von Mach *et al.* 2004) und in (F) ungesortete Nabelschnurblutzellen (Sharma *et al.* 2005).

Die in der Literatur beschriebenen nach Transplantation von Stammzellen gefundenen Zellen (Abbildung 34A-F) entsprechen in Morphologie und Verteilung den hier beschriebenen Typ I-Zellen. Gemeinsam ist den gezeigten Beispielen, dass die gefundenen Zellen einzeln im Gewebe vorliegen, oftmals außerdem wie bei den von mir gezeigten Beispielen in Nachbarschaft zu Gefäßen. Dies ist plausibel, da die Zellen durch die Injektion (unabhängig davon, ob via Schwanzvene, Milz, oder direkt ins Parenchym) in die Blutlaufbahn geraten. Somit ist plausibel, dass in den gefäßnäheren Gewebebereichen häufiger Zellen zu finden sind. Die Charakterisierung der transplantierten Zellen wurde wie in meiner Arbeit immunhistochemisch über humanes Albumin (Abbildung 34A, B, C, E, F) oder HepPar1 (Abbildung 34D) durchgeführt. Die so dargestellten Zellen wurden je nach Arbeitsgruppe als funktionale Hepatozyte oder Leberzelle (Danet *et al.* 2002; Kakinuma *et al.* 2003) oder als Hepatozyten-ähnliche Zelle (Wang *et al.* 2003b; Kollet *et al.* 2003; Sharma *et al.* 2005; von Mach *et al.* 2004) bezeichnet.

5.4 Typ I-Zellen

Die Hepatozyten-ähnliche Morphologie sowie die Expression humanen Albumins der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Typ I-Zellen legen nahe, dass eine echte Transdifferenzierung der transplantierten Zellen stattgefunden haben könnte. Zurzeit wird die Möglichkeit der Fusion der transplantierten Zellen mit originären Mauszellen immer noch kontrovers diskutiert. Für Tiermodelle wie das FAH^{-/-}-Mausmodell konnte eine Fusion transplantierter Stammzellen mit Hepatozyten gezeigt werden. Andererseits ist Fusion durch den Selektionsdruck dieses Tiermodells begünstigt. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass sich humane Stammzellen nach Transplantation in immundefiziente Mäuse anders verhalten und transdifferenzieren, anstatt zu fusionieren. Vorrangig wurde in der vorliegenden Arbeit daher die Identität der human Albumin-positiven Zellen untersucht. Mit der Technik der kombinierten Immunhistochemie auf humanes Albumin und *in situ* Hybridisierung unter Verwendung von Sonden für *Alu*-Sequenzen und Mouse-major-satellite-DNA wurde untersucht, welche Identität die human Albumin-positiven Typ I-Zellen haben. Hierbei wurde keine human Albumin-positive Typ I-Zelle gefunden, die gleichzeitig positiv für *Alu*-Sequenzen ist. Gleichwohl konnte ein Mouse-major-satellite-DNA positiver Kern in einer human Albumin-positiven Typ I-Zelle gefunden werden. Dieses überraschende Ergebnis widerspricht der Fusion als zugrundeliegendem Mechanismus zur Entstehung human Albumin-positiver Typ I-Zellen. In einem solchen Fall hätten sowohl *Alu*-Sequenzen als auch Mouse-major-satellite-DNA kolokalisiert im Kern vorkommen müssen. Gleichfalls legt dieses Ergebnis nahe, dass Transdifferenzierung der transplantierten humanen Zellen nicht ursächlich für human Albu-

min-positive Typ I-Zellen ist. In diesem Falle müssten Typ I-Zellen vorliegen, die gleichzeitig positiv für *Alu*-Sequenzen sind. Gegen die Fusion als Mechanismus zur Entstehung der Typ I-Zellen spricht zusätzlich, dass bei simultaner Immunhistochemie auf humanes und murines Albumin keine Zellen gefunden wurden, die Albumin beider Spezies exprimieren.

Der Mechanismus der Entstehung der human Albumin-positiven, Mouse-major-satellite-DNA-positiven und *Alu*-DNA-negativen Typ I-Zellen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht aufgeklärt. Zu diskutieren wäre ein horizontaler Gentransfer. In der Literatur ist vielfach beschrieben, dass Plasmid-DNA nach Injektion ins Versuchstier in die Hepatozyten, aber auch in andere Zelltypen aufgenommen werden kann (Sebestyen *et al.* 2006; Zhang *et al.* 1999; Kusano *et al.* 2005; Liu *et al.* 1999). Die Aufnahme in die Zelle kann prinzipiell über Poren in der Membran, durch Risse in der Zellmembran, oder rezeptorvermittelt stattfinden (Yakubov *et al.* 1989; Budker *et al.* 2000). Ausgehend davon wäre denkbar, dass zur Entstehung human Albumin-positiver Typ I-Zellen die Injektion humaner DNA ausreichend ist, die dann in die Hepatozyten aufgenommen wird. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit Transplantationsversuche durchgeführt, bei denen eine den üblicherweise transplantierten Zellen äquivalente Menge DNA injiziert wurde. Da die Auswertung dieses Versuchs weder in der Immunhistochemie noch in der Intron-PCR positiv war, reicht die Injektion genomischer DNA ins Leberparenchym alleine nicht aus. In der Literatur wird beschrieben, dass die Aufnahme von Plasmid-DNA durch hohe Drücke bei der Injektion begünstigt ist. Bei der Injektion einer Zellsuspension von 750.000 Zellen in 100µL Volumen ist zu erwarten, dass durch Gefäßembolien ein hoher Druck entstehen könnte, der möglicherweise die Aufnahme von DNA aus bei der Injektion geschädigten Stammzellen in die Hepatozyten erleichtern könnte. Weiterhin könnte die entzündliche Reaktion infolge der Zellinjektion die Aufnahme von Fremd-DNA begünstigen.

5.5 Typ II-Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurde nach Transplantation humaner Stammzellen in das Leberparenchym immundefizienter Mäuse ein zweiter morphologisch vom Typ I unterschiedlicher Zelltyp beobachtet. Mittels *in situ* Hybridisierung konnte gezeigt werden, dass die Typ II-Zellen einen humanen Zellkern besitzen. Da die *Alu*-positiven Kerne außerdem in CM-DiI-positiven Arealen gefunden wurden, ist sichergestellt, dass es sich bei den humanen Kernen um die Zellkerne der transplantierten Stammzellen handelt. Verglichen mit den Typ I-Zellen weisen die Typ II-Zellen eine geringere Zellgröße, einen dezentralen kleineren Zellkern und ein zum Zytoplasma verschobenes Kern-Zytoplasma-Verhältnis auf. Im Gegensatz zu Typ I-Zellen kommen die Typ II-Zellen nicht vereinzelt, sondern in Zellagglomeraten aus mehreren

Zellen vor. Immunhistochemisch konnte in Typ II-Zellen ebenso wie in Typ I-Zellen die Expression humanen Albumins gezeigt werden.

Mithilfe histologischer Standardfärbungen wurden die mit Stammzellen transplantierten Lebern untersucht. In der Berliner Blau-Färbung auf Eisen wurden im transplantierten Gewebe Eisen-positive Zellagglomerate nachgewiesen, die in ihrer Größe und Ausdehnung den Typ II-Zellen entsprechen. Beim Injizieren einer Zellsuspension in das Leberparenchym kommt es durch die Verletzung des Gewebes zu Einblutungen. Das in den Zellen nachgewiesene Eisen könnte infolge dessen aus dem Hämoglobin der Erythrozyten aufgenommen worden sein. Eisen-positive Zellareale wurden in scheintransplantierten Geweben nicht beobachtet. Neben der Berliner Blau-Färbung wurde eine PAS-Färbung zum Nachweis von Glykogen durchgeführt. Auch hier wurden im transplantierten Gewebe PAS-positive Zellareale gefunden, die in ihrer Ausdehnung und Größe den Typ II-Zellen entsprechen. Die PAS-Färbung stellt allerdings nur einen Hinweis auf eine Speicherung von Glykogen dar, da hierbei kein spezifisches Antigen detektiert wird. Neben Glykogen reagieren auch neutrale Mukopolysaccharide, Glykoproteine, Phospholipide und andere Verbindungen mit zwei benachbarten Hydroxygruppen positiv in der PAS-Reaktion. Außer Hepatozyten können auch Makrophagen PAS-positiv sein, was diagnostisch von Bedeutung ist (Lepidi *et al.* 2003).

Für die Entstehung der Typ II-Zellen ist ein anderer Weg als bei den Typ I-Zellen zu diskutieren. Durch die Kolo-kalisation von *Alu*-positiven Kernen in CM-DiI-positiven Arealen wurden die transplantierten Zellen im Gewebe eindeutig nachgewiesen. Außerdem wurde gezeigt, dass in den CM-DiI-positiven Zellarealen humanes Albumin exprimiert wurde. Für die transplantierten Stammzelltypen wurde immunhistochemisch gezeigt, dass vor der Transplantation kein humanes Albumin exprimiert wird. Durch die Mikroumgebung der Mausleber kam es zu einer teilweisen Differenzierung der transplantierten humanen Stammzellen, infolge der Albumin in den humanen Zellen exprimiert wurde. Untersuchungen auf andere Hepatozyten-Marker wie CYP3A4, die in einer kooperierenden Arbeitsgruppe durchgeführt wurden, waren negativ. Dies könnte dadurch begründet sein, dass die Bildung von Albumin, anders als die Bildung von CYP3A4, schon in frühen Reifestadien einer Hepatozyte stattfindet. Höhere Hepatozytenfunktionen wie die Cytochrom P450 katalysierte Phase I des Fremdstoffmetabolismus erfordern wahrscheinlich eine vollständigere Differenzierung, als die von mir transplantierten Stammzellen erreicht haben.

Nach Transplantation von Nabelschnurblutzellen wurde eine charakteristische Kinetik des Auftretens von Typ II-Zellen beobachtet. Es fiel auf, dass zwischen 4h und 24h nach Transplantation die in Anzahl *Alu*-positiver Kerne ein Maximum erreichte. Zwischen 24h und

5d nach Transplantation nahm die Anzahl humaner Kerne weiter ab. 21d nach Transplantation der humanen Zellen wurden nur noch vereinzelt Zellkerne humanen Ursprungs gefunden. Dieser überraschende Verlauf ist mit einer Umverteilung der injizierten Zellen zwischen 4h und 24h nach Transplantation erklärbar. Durch die Injektion der Zellsuspension ins Leberparenchym finden die gespritzten Zellen zunächst überwiegend Anschluss an die großen Gefäße, die belegt werden. Erst im Laufe der Zeit über 12h und 24h nach Transplantation kommt es zu einer Umverteilung der transplantierten humanen Zellen im Lebergewebe. Auch kleinere Gefäße werden erreicht, ein Teil der Zellen kann das Gewebe infiltrieren, so dass insgesamt die Anzahl der gefundenen *Alu*-positiven Kerne ansteigt. Zwischen 24h und 21d nach Transplantation wurden immer weniger Kerne humanen Ursprungs gefunden. Dieses Ergebnis wird durch die in Kooperation durchgeführte Duplex-PCR zur Detektion humaner DNA im Mausgewebe bestätigt. Die hierbei beobachtete Abnahme nachweisbarer humaner DNA erreichte von 4h über 12h, 24h, 5d nach 21d die Bestimmungsgrenze der Methode. Da zur Isolierung der DNA ein Gewebestück aufgearbeitet wurde und nicht nur ein Gewebeschnitt ausgewertet wurde, spielt die bei der *in situ* Hybridisierung beobachtete Umverteilung zwischen 4h und 24h eine geringere Rolle. Daher sind die Gehalte humaner DNA von 4h bis hin zu 5d in einem ähnlichen Bereich und nehmen erst zwischen 5d und 21d ab. Innerhalb von drei Wochen nach Transplantation ist der größte Teil der humanen Zellen abgestorben. Dies ist wahrscheinlich durch das Experiment selbst begründet. Um Immunreaktionen zu vermeiden, wurden die Transplantationen in immundefiziente Mäuse durchgeführt. Dennoch zeigt das Ergebnis der Transplantationskinetik, dass die murine Leber keine optimale Umgebung für die transplantierten humanen Zellen darstellt, da nach 21d bereits kaum noch *Alu*-positive Kerne oder humane DNA nachgewiesen werden können.

Humane Stammzellen wurden in immundefiziente Mäuse transplantiert. Dort wurde trotz der Speziesunterschiede ein Teil der anfangs injizierten Zellen nach 21d wiedergefunden. Auch wenn die Mausleber keine optimalen Lebensbedingungen für die humanen Stammzellen geboten hat, haben einige der transplantierten Zellen durch die Mikroumgebung der Mausleber eine teilweise Differenzierung erfahren. So wurde immunhistochemisch die Expression humanen Albumins in *Alu*-positiven Zellen gezeigt, die in einem CM-DiI-positiven Zellagglomerat lagen.

5.6 Charakterisierung der eingesetzten Nabelschnurblutzellen

Zur Charakterisierung der transplantierten adhärent proliferierenden Nabelschnurblutzellen, sind diese in Kooperation mit Dr. Spitkovsky, Universität Köln, am FACS auf bestimmte CD-Marker (*engl. cluster of differentiation*) hin untersucht worden. CD-Marker sind

Oberflächenantigene, anhand derer sich die Zellen klassifizieren lassen. Meist handelt es sich hierbei um Glykoproteine, die membrangebunden vorkommen. Neben Rezeptor- und Signaleigenschaften können CD-Marker auch enzymatische Aktivitäten besitzen. Die von mir transplantierten adhärent proliferierenden Nabelschnurblutzellen wurden anhand einiger CD-Marker mit einem anderem publizierten Nabelschnurstammzelltyp (Kogler *et al.* 2004) verglichen. Anhand Fluoreszenz-markierter monoklonaler Antikörper gegen die jeweiligen Epitope der untersuchten cluster of differentiation können die Zellen im FACS mit Kontrollen (Isotyp-Antikörper) verglichen werden, um festzustellen, ob ein bestimmtes Oberflächenantigen vorhanden ist. Untersucht wurden in der vorliegenden Arbeit insgesamt zehn CD-Marker, von denen acht auch von Kogler *et al.* bestimmt wurden. Diese acht Marker sind sowohl bei Kogler *et al.*, als auch bei den vor mir transplantierten Zellen auf gleiche Weise exprimiert.

Eines der untersuchten Oberflächenantigene war CD10, auch bekannt unter dem Namen CALLA (*engl. common acute lymphoblastic leukemia antigen*). Exprimiert wird

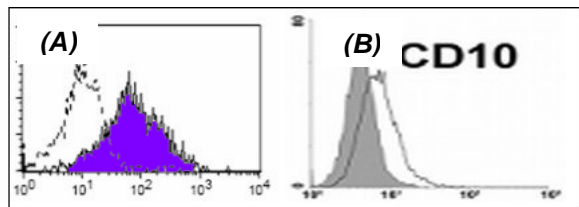


Abbildung 35: Die Expression von CD10 in den von mir verwendeten Nabelschnurblutzellen (A, blau) im Vergleich zu Kogler *et al.* (B, farblos). Im Vergleich zu den Negativkontrollen in (A) und (B) schwache Expression von CD10. (B) (Kogler *et al.* 2004)

CD10 vor allem in B- und T-Vorläuferzellen, einigen Granulozyten und Knochenmarksstromazellen. Keine Expression findet hingegen in murinen B- und T-Zellen sowie Granulozyten statt. In der Klinik wird CALLA zur Identifikation leukämischer Zellen verwendet. Auch können mit CD10 hepatozelluläre und nicht-hepatozelluläre Karzinome differenziert werden (Pernick 2006; Wahn *et al.* 2005; WSU 2006; Science Gateway 2006). Im Vergleich beider Nabelschnurblutzelltypen mit den Negativkontrollen (Abbildung 35) ist nur eine schwache Expression von CD10 erkennbar. Beide Nabelschnurstammzelltypen zeigen eine vergleichbare Expression.

Das Oberflächenantigen CD13 ist vor allem auf bei Granulozyten und Monozyten zu detektieren. Weiterhin findet auch eine Expression bei Lymphozyten, Fibroblasten und den

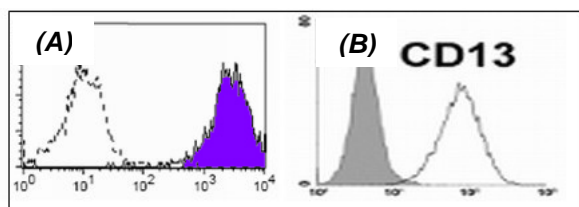


Abbildung 36: Die Expression von CD13 in den von mir verwendeten Nabelschnurblutzellen (A, blau) im Vergleich zu Kogler *et al.* (B, farblos). Im Vergleich zu den Negativkontrollen in (A) und (B) starke Expression von CD13. (B) (Kogler *et al.* 2004)

Zellen, die die Gallengangskanälchen auskleiden, statt. Wie auch CD10 hat CD13 enzymatische Eigenschaften als Metalloprotease in der Extrazellulärmatrix. CD13-Autoantikörper sind assoziiert mit chronischen Immunreaktionen nach Knochenmarkstransplantationen. Enzymatisch ist CD13 als Zink-Metalloproteinase aktiv (Pernick 2006; Wahn *et al.* 2005; WSU

2006;Science Gateway 2006). CD13 wird in beiden verglichenen Stammzelltypen stark exprimiert (Abbildung 36).

In Leukozyten, aber auch den meisten anderen Zelltypen wird CD29 exprimiert. Von CD29 gibt es vier Isoformen, bezeichnet mit A-D, welche sich durch unterschiedliche zytoplasmatischen Domänen voneinander unterscheiden. Die B-Isoform ist in der Placenta und von den Endothelzellen der Nabelschnurvene exprimiert, die C-Isoform ist in hämatopoetischen Zelllinien exprimiert. Die Wirkung von Tacrolimus, ein nach Transplantationen verwendetes Immunsuppressivum, wirkt möglicherweise über Inhibition von CD29 (Munakata *et al.* 2004).

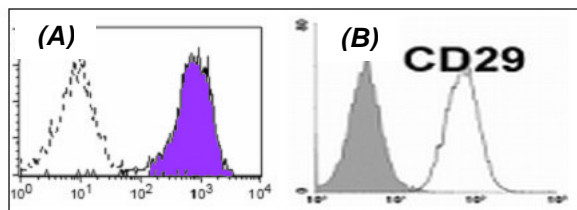


Abbildung 37: Die Expression von CD29 in den von mir verwendeten Nabelschnurblutzellen (A, blau) im Vergleich zu Kogler *et al.* (B, farblos). Im Vergleich zu den Negativkontrollen in (A) und (B) starke Expression von CD29. (B) (Kogler *et al.* 2004)

Weiterhin ist CD29 wesentlich an Zell-Zell-Adhäsion beteiligt, da es Heterodimere mit Integrinen, u.a. CD49a-f bildet. Wegen seiner Schlüsselrolle in der Zell-Zell-Adhäsion und Erkennung ist CD29 in einer Vielzahl von Prozessen von Embryogenese, Immunantwort und der Metastasierung von Tumorzellen beteiligt. Auch wird für CD29 eine Bedeutung in der Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen angenommen (Pernick 2006;Wahn *et al.* 2005;WSU 2006;Science Gateway 2006). Sowohl in den von Kogler *et al.*, als auch bei den in der vorliegenden Arbeit transplantierten Nabelschnurblutstammzellen ist CD29 stark exprimiert. Wegen der Schlüsselstellung dieses Oberflächenmarkers für viele zelluläre Prozesse und dem häufigen Vorkommen auf verschiedenen Zelltypen überrascht die Expression auf den transplantierten Stammzellen nicht.

Ein bekannter Marker hämatopoetischer Stammzellen ist CD34, der auch in Endothelzellen und anderen Zelltypen exprimiert sein kann. Physiologisch spielt CD34 bei Zell-Zell-Adhäsion eine Rolle. Außerdem wird angenommen, dass CD34 die Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen inhibiert. CD34 ist häufigster Ligand für CD62L (L-Selektin; Leukozyten-Adhäsionsmolekül). Aufgrund seiner Affinität zu CD62L und E und der Expression von CD34 in Endothelzellen kann eine Bedeutung von CD34 für Leukozyten-Endothel-Wechselwirkungen angenommen werden. *In vitro* verlieren CD34⁺-Zellen bereits nach wenigen Passagen ihre CD34-Aktivität (Pernick 2006;Wahn *et al.* 2005;WSU 2006;Science Gateway 2006).

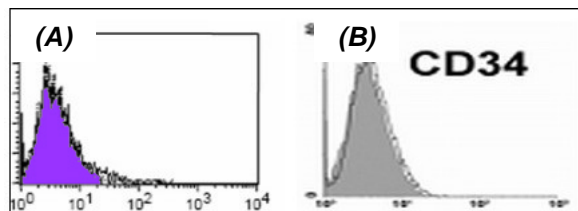


Abbildung 38: Die Expression von CD34 in den von mir verwendeten Nabelschnurblutzellen (A, blau) im Vergleich zu Kogler et al. (B, farblos). Im Vergleich zu den Negativkontrollen in (A) und (B) keine Expression von CD34. (B) (Kogler *et al.* 2004)

Die miteinander verglichenen Nabelschnurstammzelltypen haben keine Expression von CD34 (Abbildung 38). Dies ist zu erwarten, da der von mir und von Kogler et al. transplantierte adherent proliferierende Nabelschnurstammzelltyp mesenchymal und nicht hämatopoetisch ist.

Das Oberflächenmolekül CD44 wird von den allermeisten Zelltypen exprimiert, nicht aber in Hepatozyten. Physiologisch bedeutsam ist CD44 als Rezeptor für Hyaluronsäure, aber auch andere Makromoleküle wie Wachstumsfaktoren. Über CD44 wird Zelladhäsion von Leukozyten sowie die Aktivierung von T-Zellen bewirkt. Da durch CD44 die zelluläre Orientierung (Polarität) gesteuert wird, trägt CD44 auf diesem Weg möglicherweise zur Proliferation und Migration von Zellen bei (Pernick 2006;Wahn *et al.* 2005;WSU 2006;Science Gateway 2006).

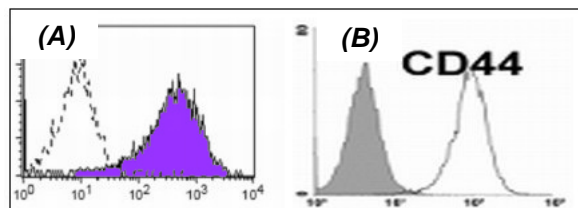


Abbildung 39: Die Expression von CD44 in den von mir verwendeten Nabelschnurblutzellen (A, blau) im Vergleich zu Kogler et al. (B, farblos). Im Vergleich zu den Negativkontrollen in (A) und (B) starke Expression von CD44. (B) (Kogler *et al.* 2004)

Beide miteinander verglichenen Zelltypen sind stark positiv für CD44 (Abbildung 39). Aufgrund der Expression dieses Oberflächenmarkers auf einer Vielzahl von Zelltypen, mit Ausnahme von Hepatozyten, ist dieses Ergebnis nicht überraschend. Hierdurch wird aber gezeigt, dass humane CD44⁺ Zellen nach Transplantation ins Versuchstier Hepatozyten-Marker exprimieren können, was auf eine teilweise Differenzierung der transplantierten Zellen hindeutet.

Auf T-Zell-Subpopulationen, Monozyten und Thrombozyten wird das Oberflächenantigen CD49e exprimiert. Zusammen mit CD29 bildet es Heterodimere und vermittelt die Bindung von Fibronectin und Fibrinogen. Dadurch entsteht ein für T-Zellen stimulierendes

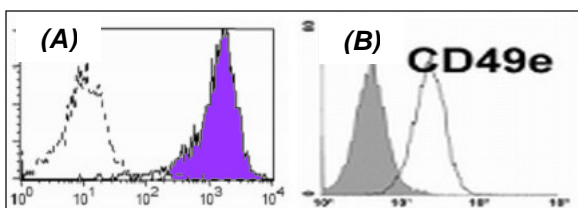


Abbildung 40: Die Expression von CD49e in den von mir verwendeten Nabelschnurblutzellen (A, blau) im Vergleich zu Kogler et al. (B, farblos). Im Vergleich zu den Negativkontrollen in (A) und (B) starke Expression von CD49e. (B) (Kogler *et al.* 2004)

Signal. Die Heterodimere von CD49E und CD29 werden auch als VLA (*engl. very late antigen*) bezeichnet, da sie erst Wochen nach Stimulation auf den Leukozyten exprimiert werden (Pernick 2006;Wahn *et al.* 2005;WSU 2006;Science Gateway 2006). CD49e ist in beiden Na-

belschnurstammzelltypen verglichen mit den Kontrollzellen stark exprimiert (Abbildung 40). Da CD49e und CD29 als Heterodimer vorkommen und bereits CD29 in den betrachteten Nabelschnurblutzellen exprimiert war, ist die Expression von CD49e nicht überraschend.

Der in hämatopoetischen Stammzellen und Neuronen exprimierte CD90 ist wahrscheinlich an der Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen beteiligt. In den von mir transplantierten Nabelschnurblutzellen ist er ebenso wie in den von Kogler et al. transplantierten Zellen nicht exprimiert (Abbildung 41). Dies ist insofern überraschend, als dass die betrachteten Stammzellen mesenchymalen Charakter haben, CD90 aber unter anderem ein Mar-

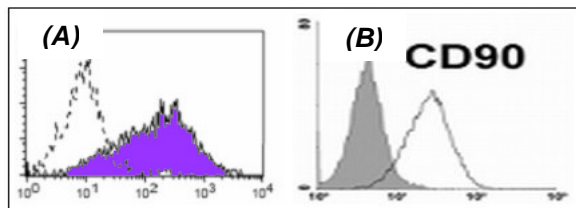


Abbildung 41: Die Expression von CD90 in den von mir verwendeten Nabelschnurblutzellen (A, blau) im Vergleich zu Kogler et al. (B, farblos). Im Vergleich zu den Negativkontrollen in (A) und (B) starke Expression von CD90. (B) (Kogler *et al.* 2004)

ker für hämatopoetische Stammzellen ist. Dies ist möglicherweise damit erklärbar, dass die Selektion der mesenchymalen Nabelschnurblutzellen über adhärentes Wachstum geschieht. Dabei wird aber immer eine Mischpopulation an Zellen resultieren, die zwar überwiegend aus mesenchymalen Nabelschnurstammzellen besteht, aber auch andere Zelltypen enthalten kann.

CD105 ist ein Oberflächenmarker, der vor allem in Endothelzellen, aktivierten Monozyten und Makrophagen, sowie in Subpopulationen von Knochenmarkszellen gebildet

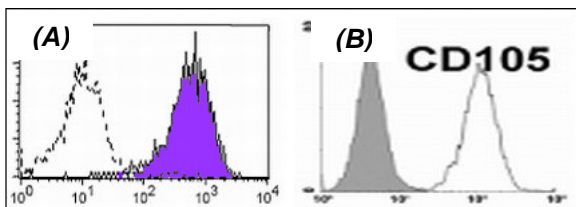


Abbildung 42: Die Expression von CD105 in den von mir verwendeten Nabelschnurblutzellen (A, blau) im Vergleich zu Kogler et al. (B, farblos). Im Vergleich zu den Negativkontrollen in (A) und (B) starke Expression von CD105. (B) (Kogler *et al.* 2004)

wird. Physiologisch ist CD105 ein Rezeptor für TGF β (*engl. transforming growth factor β*), und spielt somit eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung sowie der Differenzierung von Zellen und Geweben (Pernick 2006; Wahn *et al.* 2005; WSU 2006; Science Gateway 2006). Sowohl bei den von Kogler et al. als auch bei den von mir transplantierten Nabelschnurblutstammzellen ist CD105 stark exprimiert (Abbildung 42). Durch die Expression des Differenzierungsmarkers CD105 wird das Potential der betrachteten Nabelschnurblutzellen zu einer möglichen Differenzierung angedeutet.

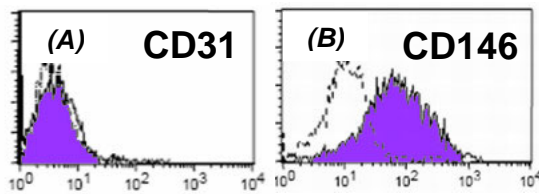


Abbildung 43: (A) Die Expression des Endothelzellmarkers CD31 in den betrachteten Nabelschnurzellen (blau) ist negativ. (B) CD146 ist verglichen mit den Kontrollen in den Stammzellen (blau) schwach exprimiert.

betrachteten Stammzellen nicht exprimiert (Abbildung 43A). CD31 vermittelt die Migration von Zellen über das Endothel hinweg. Ferner ist CD31 an Angiogenese und der Entfernung neutrophiler Granulozyten aus dem Blut beteiligt (Pernick 2006; Wahn *et al.* 2005; WSU 2006; Science Gateway 2006; O'Brien *et al.* 2003). Das Fehlen von CD31 bei den von mir verwendeten Nabelschnurblutzellen weist sie Zellen als nicht Endothelzellen aus. Leicht positiv im Vergleich zu Kontrollzellen sind die in dieser Arbeit verwendeten Nabelschnurblutzellen für den Oberflächenmarker CD146 (Abbildung 43B). Dieser ist unter anderem in aktivierten T-Zellen exprimiert und für Zelladhäsion mitverantwortlich.

Von Kogler *et al.* wurden adhärent proliferierende Nabelschnurblutstammzellen in Schafe transplantiert. Durch einen Vergleich charakteristischer CD-Marker wurden die von mir transplantierten Zellen mit den von Kogler *et al.* publizierten Zellen verglichen. Hierbei zeigte sich, dass das Muster der Expression in beiden verglichenen Zelltypen ähnlich ist. Marker hämatopoetischer Stammzellen wie CD34 sind in beiden Zelltypen nicht exprimiert, da es sich bei adhärent proliferierenden Nabelschnurblutzellen um mesenchymale Stammzellen handelt. Die positive Expression von CD44 zeigt, dass die verwendeten Zelltypen vor Transplantation keine Hepatozyten waren und die Expression humaner Hepatozytenfaktoren eine Folge möglicher Transdifferenzierung ist. Dass die von mir transplantierten Nabelschnurblutzellen keine Endothelzellen sind, ist durch nicht exprimiertes CD31 gezeigt. Ferner sind in beiden miteinander verglichenen Nabelschnurzelltypen die Marker CD90 und CD105 exprimiert, die an der Differenzierung von Zellen beteiligt sind. Ebenfalls in beiden betrachteten Zelltypen findet die Expression von CD13 und CD29 statt. Beide Marker sind mit Immunreaktionen assoziiert, die nach Transplantation auftreten können. Dies spielt im Hinblick auf eine potentielle Verwendung beim Menschen eine Rolle. Da für die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Experimente immundefiziente Mäuse verwendet wurden, ist die Expression von CD13 und CD29 nicht kritisch.

Neben diesen Markern wurden die von mir transplantierten Nabelschnurblutstammzellen auch auf weitere Oberflächenantigene untersucht, die von Kogler *et al.* nicht charakterisiert wurden. Der in Monozyten, Granulozyten, T-Zellsubpopulationen und vor allem in Endothelzellen exprimierte Marker CD31 ist in den

5.7 Hepatopankreatische Vorläuferzellen und Neohepatozyten

Schwerpunktmäßig wurde in der vorliegenden Arbeit das Schicksal adhärent proliferierender Nabelschnurblutzellen nach Transplantation in immundefiziente Mäuse untersucht. Vergleichend wurden native und immortalisierte hepatopankreatische Vorläuferzellen und *in vitro* vordifferenzierte Neohepatozyten in das gleiche Tiermodell transplantiert.

Während der Differenzierung eines Embryos in der Embryogenese entstehen die Leber und das Pankreas aus dem gleichen Keimblatt, dem Entoderm. Von Deutsch et al. wurden gemeinsame Vorläuferzellen für Leber und Pankreas beschrieben (Deutsch *et al.* 2001), aus denen sich im Laufe der Embryogenese die entsprechenden Organe entwickeln. Daher ist es nicht überraschend, dass nach Transplantation humaner aus dem Pankreas gewonnener Stammzellen von mir immunhistochemisch human Albumin-positive Zellen gefunden wurden. Wie auch für die adhärent proliferierenden Nabelschnurblutzellen beschrieben, wurden hierbei zwei Typen human Albumin positiver Zellen gefunden. In diesen Experimenten wurden sowohl native als auch immortalisierte hepatopankreatische Stammzellen transplantiert. Hinsichtlich der Verteilung von Typ I- und Typ II-Zellen unterscheiden sich beide Zelltypen qualitativ voneinander. Während die nativen Stammzellen eine den Nabelschnurblutstammzellen ähnliche Verteilung zeigten, wurden nach Transplantation immortalisierter hepatopankreatischer Stammzellen fast ausschließlich Typ II-Zellen beobachtet. Eines der Merkmale der Typ II-Zellen ist, dass sie im Gegensatz zu Typ I-Zellen in größeren Zellagglomeraten im Gewebe vorkommen. Aufgrund der guten *in vitro* Proliferation der immortalisierten Zellen ist es plausibel, dass auch nach Transplantation ein starkes Wachstum der injizierten Stammzellen stattfindet. Als Folge davon wurden fast ausschließlich human Albumin-positive Typ II-Zellen beobachtet. Hinsichtlich einer potentiellen späteren Anwendung am Menschen könnte ein solches Zellwachstum problematisch sein, da eine Kanzerogenität der immortalisierten hepatopankreatischen Stammzellen nicht ausgeschlossen werden kann.

Mit Blick auf eine potentielle klinische Anwendung am Menschen sind die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen aus *in vitro* Differenzierung von peripheren Blutmonozyten gewonnenen Neohepatozyten interessant. Im Unterschied zu den weiteren von mir verwendeten Stammzelltypen eignen sich die Neohepatozyten für autologe Transplantationen, da Blutspender und Empfänger der aus dem Blut gewonnen vordifferenzierten Zellen die gleiche Person sein können. Immunreaktionen sind daher unwahrscheinlich, so dass auf die Anwendung immunsupprimierender Medikamente verzichtet werden kann, da diese starke Nebenwirkungen haben können. In der vorliegenden Arbeit wurden *in vitro* vordifferenzierte Neohepatozyten in immundefiziente Mäuse transplantiert. Hierbei wurden nach 21d sowohl hu-

man Albumin-positive Typ I- und Typ II-Zellen gefunden, deren Verhältnis qualitativ dem der adhärent proliferierenden Nabelschnurblutzellen entspricht. Die nach Transplantation immortalisierter hepatopankreatischer Stammzellen gefundenen Typ II-Zellareale waren in den Neohepatozyten-Transplantationen nicht zu erwarten, da diese im ausdifferenzierten Zustand bereits *in vitro* nicht mehr proliferieren.

Nach Transplantation von Stammzellen aus verschiedenen Quellen in das Leberparenchym immundefizienter Mäuse wurden human Albumin-positive Zellen gefunden. Diese wurden in zwei morphologisch unterscheidbare Typen eingeteilt. Das Verhältnis von Typ I- zu Typ II-Zellen ist bei allen nicht-immortalisierten von mir transplantierten Zelltypen ähnlich. Wurden immortalisierte hepatopankreatische Vorläuferzellen transplantiert, wurden ganz überwiegend Typ II-Zellareale beobachtet. Dies legt die Vermutung nahe, dass für das Entstehen human Albumin-positiver Zellen der Ursprung der verwendeten Stammzellen nicht entscheidend ist, wohingegen die Immortalisierung der Stammzellen Einfluss auf das Verhältnis von Typ I- und Typ II-Zellen hat.

5.8 *In vitro* Charakterisierung der Neohepatozyten

Für die Neohepatozyten sind bereits metabolische Aktivitäten publiziert, die beispielsweise eine Albuminsynthese vergleichbar der humaner primärer Hepatozyten belegen (Ruhnke *et al.* 2005c). In einer klinischen Anwendung könnten die bereits differenzierten Neohepatozyten möglicherweise nach Transplantation per se Funktionen der Wirtsleber ergänzen. In der vorliegenden Arbeit wurde die metabolische Kapazität der Neohepatozyten im EROD-Assay untersucht, der ein Maß für die CYP1A-Aktivität ist. Da eine wesentliche Eigenschaft von humanen Hepatozyten die Induzierbarkeit der fremdstoffmetabolisierenden Enzyme ist, wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, die CYP1A-Aktivität der Neohepatozyten durch 3-Methylcholanthren zu induzieren (Hengstler *et al.* 2005). Überraschenderweise wurde in keiner der untersuchten Proben eine mit dem EROD-Assay messbare Induktion der CYP1A-Aktivität beobachtet. Zwar wurde von mir im EROD-Assay eine metabolische Aktivität der Neohepatozyten beobachtet, die allerdings nicht durch 3-Methylcholanthren induzierbar war, da der Umsatz von 7-Ethoxyresorufin zu Resorufin in den Kontrollen in gleichem Umfang stattfand. Da allerdings die Induzierbarkeit bestimmter fremdstoffmetabolisierender Enzyme eine Kerneigenschaft echter Hepatozyten ist, fehlt den Neohepatozyten hier die für CYP1A-Isoenzyme wesentliche Eigenschaft. Dies ist insbesondere erstaunlich, da für humane Blutlymphozyten eine Induzierbarkeit für CYP1A-Isoenzyme im EROD-Assay beschrieben ist (Lang *et al.* 1996).

Für die Neohepatozyten konnte in der vorliegenden Arbeit eine im EROD-Assay messbare metabolische Aktivität der CYP1A-Isoenzyme gezeigt werden. Anders als bei primären humanen Hepatozyten üblich, konnte die CYP1A-Aktivität nicht durch 3-Methylcholanthren im Vergleich zu den Kontrollen induziert werden. In diesem Punkt fehlen den Neohepatozyten metabolische Eigenschaften echter Hepatozyten. Aufgrund weiterer Charakterisierung von Ruhnke et al. ist zudem bekannt, dass die Neohepatozyten keine induzierbare CYP3A4-Aktivität haben, wohl aber zur UDP-Glucoronidierung (Phase II-Metabolismus) in der Lage sind. Weiterhin konnte von Ruhnke et al. in Neohepatozyten eine Aktivität des Harnstoffzyklus und Sekretion humanen Albumins in das Kulturmedium gezeigt werden. Beide Parameter finden in ähnlichem Maß wie bei primären humanen Hepatozyten statt (Ruhnke *et al.* 2005c). Ebenfalls wurden von mir 21d nach Transplantation von Neohepatozyten immunhistochemisch human Albumin-positive Zellen in der Leber des Versuchstiers gefunden. Somit sind die *in vitro* aus peripheren Blutmonozyten vordifferenzierten Neohepatozyten kein Hepatozytenersatz, zeigen aber bereits einige Eigenschaften echter humaner Hepatozyten.

6 Zusammenfassung

Der Bedarf an Spenderlebern für die Behandlung akuter und chronischer Lebererkrankungen kann zurzeit nicht gedeckt werden. Insbesondere für metabolische Lebererkrankungen hat sich die Transplantation von Hepatozyten als Alternative zur Lebertransplantation erwiesen. Diese Therapie wird wegen Mangel an Hepatozyten ausreichender Qualität nicht flächendeckend eingesetzt. Falls es möglich wäre, Stammzellen zu Hepatozyten zu differenzieren, könnte dies für die Behandlung von Lebererkrankungen einen erheblichen Fortschritt bedeuten. Eine von vielen Arbeitsgruppen verfolgte Strategie zur Beurteilung des Differenzierungspotentials hepatischer Vorläuferzellen ist die Transplantation in die Leber immundefizienter Mäuse. Die in der vorliegenden Arbeit verfolgte Strategie bestand darin, zunächst 750.000 zu beurteilende Zellen entweder direkt in das Parenchym des linken Leberlappens oder in die Milz zu injizieren. Die anschließende Analytik verfolgte folgende Ziele: i) Identifikation der transplantierten Zellen. Dies wurde durch den kombinierten Einsatz von CM-DiI und Sonden gegen humane *Alu*-Sequenzen erreicht. Hierbei markierte CM-DiI lediglich grob die Areale, in die transplantiert wurde. Die *in situ* Hybridisierung mit *Alu*-Sonden ermöglichte die konkrete Identifikation humaner Kerne. ii) Analyse der Expression hepatischer Faktoren, die von den ursprünglichen Stammzellen nicht gebildet wurden. Hierzu wurde ein für humanes Albumin spezifischer Antikörper eingesetzt. iii) Überprüfung, ob die human Albumin-positiven Zellen menschlichen Ursprungs sind. Hierzu wurde eine Kombination aus *in situ* Hybridisierung mit *Alu*-Sonden und Immunhistochemie gegen humanes Albumin etabliert. Als Positivkontrolle dienten in der vorliegenden Arbeit primäre humane Hepatozyten. Das Ergebnis nach Transplantation humaner Hepatozyten wurde mit dem Ergebnis nach Transplantation adhärent proliferierender Nabelschnurblutzellen, hepatopankreatischen Vorläuferzellen und aus peripheren humanen Blutmonozyten *in vitro* ausdifferenzierten Neohepatozyten verglichen.

Anhand positiver Rotfluoreszenz wurden bereits im paraffinisierten Schnitt die Bereiche der transplantierten CM-DiI-markierten Stammzellen identifiziert. Durch die *in situ* Hybridisierung mit Mensch-spezifischen *Alu*-Sonden wurden in den CM-DiI-positiven Arealen Menschkerne nachgewiesen. Immunhistochemisch wurde in diesen Bereichen eine Expression humanen Albumins gezeigt. Vom umgebenden Gewebe waren die identifizierten Zellen durch einen kleinen dezentral gelegenen Zellkern, geringe Zellgröße und einer Hepatozyten unähnlichen Morphologie zu unterscheiden. Diese Zellen traten in der Regel als kleinere Zellagglomerate auf, die entweder in Gefäßen oder ohne Endothelabgrenzung im Gewebe zu finden waren. Bei der Auswertung weiterer auf humanes Albumin untersuchter Gewebe-

schnitte wurde ein zweiter morphologisch unterschiedlicher Typ humanes Albumin-exprimierender Zellen gefunden. Dieser war durch eine perfekte Hepatozytenmorphologie mit großem, zentral gelegenen Kern und polygonaler Form der Zelle charakterisiert. Im Gewebe lagen diese Zellen vereinzelt, ohne immunhistochemische Detektion wäre eine Unterscheidung von Maushepatozyten nicht möglich gewesen. Mit der *in situ* Hybridisierung wurde für diese Zellen ein Mauskern nachgewiesen. Der seltener auftretende Zelltyp mit perfekter Hepatozytenmorphologie wurde als Typ I und der kleinzellige Zelltyp als Typ II bezeichnet. Bemerkenswert hierbei ist, dass die beobachteten Typen human Albumin-positiver Zellen nach Transplantation aller drei miteinander verglichenen Zelltypen nachweisbar waren. Eine mögliche Erklärung des Befundes der Typ II-Zellen besteht in einer teilweisen Differenzierung in Richtung Hepatozyte. Die menschlichen Zellen exprimieren zwar Albumin, nicht aber andere Faktoren wie CYP3A4, und nehmen keine hepatozelluläre Morphologie an. Ein überraschender Befund war die Typ I-Zelle. Der Mechanismus, der in diesen Zellen zur Expression humanen Albumins führt, ist zurzeit ungeklärt.

Mithilfe des EROD-Assays wurde die metabolische Aktivität der CYP1A-Isoenzyme bei *in vitro* differenzierten Neohepatozyten bestimmt. Hierbei wurde ein zeitabhängiger Umsatz von EROD zu Resorufin beobachtet, der aber nicht durch 3-Methylcholanthren induzierbar war. Damit fehlt den Neohepatozyten in diesem Punkt eine wichtige Eigenschaft primärer Hepatozyten. Allerdings sind durch publizierte Untersuchungen an Neohepatozyten weitere Hepatozyten-spezifische Parameter wie Harnstoffzyklus und Albuminproduktion belegt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass nach Transplantation humaner Vorläuferzellen verschiedenen Ursprungs ein qualitativ ähnliches Ergebnis mit zwei unterschiedlichen Typen human Albumin-positiver Zellen beobachtet wurde. Ob diese Zelltypen therapeutisch nutzbar sind, bedarf weiterer Untersuchungen, beispielsweise mit Tiermodellen für menschliche Lebererkrankungen.

7 Literaturverzeichnis

Almeida-Porada G., Porada C.D., Chamberlain J., Torabi A., & Zanjani E.D. (2004) Formation of human hepatocytes by human hematopoietic stem cells in sheep. *Blood* **104**, 2582-2590.

Alvarez-Dolado M., Pardal R., Garcia-Verdugo J.M., Fike J.R., Lee H.O., Pfeffer K., Lois C., Morrison S.J., & Alvarez-Buylla A. (2003) Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* **425**, 968-973.

Ambrosino G., Varotto S., Strom S.C., Guariso G., Franchin E., Miotto D., Caenazzo L., Basso S., Carraro P., Valente M.L., D'Amico D., Zancan L., & D'Antiga L. (2005) Isolated hepatocyte transplantation for Crigler-Najjar syndrome type 1. *Cell Transplant.* **14**, 151-157.

Avital I., Inderbitzin D., Aoki T., Tyan D.B., Cohen A.H., Ferraresso C., Rozga J., Arnaout W.S., & Demetriou A.A. (2001) Isolation, characterization, and transplantation of bone marrow-derived hepatocyte stem cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **288**, 156-164.

Beerheide W., von Mach M.A., Ringel M., Fleckenstein C., Schumann S., Renzing N., Hildebrandt A., Brenner W., Jensen O., Gebhard S., Reifenberg K., Bender J., Oesch F., & Hengstler J.G. (2002) Downregulation of beta2-microglobulin in human cord blood somatic stem cells after transplantation into livers of SCID-mice: an escape mechanism of stem cells? *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **294**, 1052-1063.

Bilir B.M., Guinette D., Karrer F., Kumpe D.A., Krysl J., Stephens J., McGavran L., Ostrowska A., & Durham J. (2000) Hepatocyte transplantation in acute liver failure. *Liver Transpl.* **6**, 32-40.

Boehnisch Th., Farmilo A.J., Stead R.H., Key M., Welcher R., Harvey R., & Atwood K.N. (2003) Immunhistochemische Färbungen, 3rd. edn. DakoCytomation GmbH.

Boyle A.L. & Ward D.C. (1992) Isolation and initial characterization of a large repeat sequence element specific to mouse chromosome 8. *Genomics* **12**, 517-525.

Brüstle O., Maskos U., & McKay R.D. (1995) Host-guided migration allows targeted introduction of neurons into the embryonic brain. *Neuron* **15**, 1275-1285.

Brüstle O., Spiro A.C., Karram K., Choudhary K., Okabe S., & McKay R.D. (1997) In vitro-generated neural precursors participate in mammalian brain development. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**, 14809-14814.

Budker V., Budker T., Zhang G., Subbotin V., Loomis A., & Wolff J.A. (2000) Hypothesis: naked plasmid DNA is taken up by cells in vivo by a receptor-mediated process. *J Gene Med.* **2**, 76-88.

Carmo H., Hengstler J.G., de Boer D., Ringel M., Carvalho F., Fernandes E., Remiao F., dos Reis L.A., Oesch F., & de Lourdes B.M. (2004) Comparative metabolism of the designer drug 4-methylthioamphetamine by hepatocytes from man, monkey, dog, rabbit, rat and mouse. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* **369**, 198-205.

Carmo H., Hengstler J.G., de Boer D., Ringel M., Remiao F., Carvalho F., Fernandes E., dos Reis L.A., Oesch F., & de Lourdes B.M. (2005) Metabolic pathways of 4-bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B): analysis of phase I metabolism with hepatocytes of six species including human. *Toxicology* **206**, 75-89.

- Cowan C.A., Atienza J., Melton D.A., & Eggan K. (2005) Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science* **309**, 1369-1373.
- Danet G.H., Luongo J.L., Butler G., Lu M.M., Tenner A.J., Simon M.C., & Bonnet D.A. (2002) C1qRp defines a new human stem cell population with hematopoietic and hepatic potential. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**, 10441-10445.
- Deutsch G., Jung J., Zheng M., Lora J., & Zaret K.S. (2001) A bipotential precursor population for pancreas and liver within the embryonic endoderm. *Development* **128**, 871-881.
- Dhawan A., Mitry R.R., Hughes R.D., Lehec S., Terry C., Bansal S., Arya R., Wade J.J., Verma A., Heaton N.D., Rela M., & Mieli-Vergani G. (2004) Hepatocyte transplantation for inherited factor VII deficiency. *Transplantation* **78**, 1812-1814.
- Ding X. & Kaminsky L.S. (2003) Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* **43**, 149-173.
- Dorko K., Freeswick P.D., Bartoli F., Cicalese L., Bardsley B.A., Tzakis A., & Nussler A.K. (1994) A new technique for isolating and culturing human hepatocytes from whole or split livers not used for transplantation. *Cell Transplant.* **3**, 387-395.
- Eberhardt M., Salmon P., von Mach M.A., Hengstler J.G., Brulport M., Linscheid P., Seboek D., Oberholzer J., Barbero A., Martin I., Muller B., Trono D., & Zulewski H. (2006) Multipotential nestin and Isl-1 positive mesenchymal stem cells isolated from human pancreatic islets. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*
- EMBL - EBI & Sanger Institute. ensembl! Genomebrowser. 2006.
Ref Type: Computer Program
- Fiegel H.C., Lioznov M.V., Cortes-Dericks L., Lange C., Kluth D., Fehse B., & Zander A.R. (2003) Liver-specific gene expression in cultured human hematopoietic stem cells. *Stem Cells* **21**, 98-104.
- Fisher R.A., Bu D., Thompson M., Tisnado J., Prasad U., Sterling R., Posner M., & Strom S. (2000) Defining hepatocellular chimerism in a liver failure patient bridged with hepatocyte infusion. *Transplantation* **69**, 303-307.
- Fox I.J., Chowdhury J.R., Kaufman S.S., Goertzen T.C., Chowdhury N.R., Warkentin P.I., Dorko K., Sauter B.V., & Strom S.C. (1998) Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. *N.Engl.J.Med.* **338**, 1422-1426.
- Francavilla A., Panella C., Polimeno L., Giangaspero A., Mazzaferro V., Pan C.E., Van Thiel D.H., & Starzl T.E. (1990) Hormonal and enzymatic parameters of hepatic regeneration in patients undergoing major liver resections. *Hepatology* **12**, 1134-1138.
- Gebhardt R., Hengstler J.G., Muller D., Glockner R., Buenning P., Laube B., Schmelzer E., Ullrich M., Utesch D., Hewitt N., Ringel M., Hilz B.R., Bader A., Langsch A., Koose T., Burger H.J., Maas J., & Oesch F. (2003) New hepatocyte in vitro systems for drug metabolism: metabolic capacity and recommendations for application in basic research and drug development, standard operation procedures. *Drug Metab Rev.* **35**, 145-213.

- Harris R.G., Herzog E.L., Bruscia E.M., Grove J.E., Van Arnem J.S., & Krause D.S. (2004) Lack of a fusion requirement for development of bone marrow-derived epithelia. *Science* **305**, 90-93.
- Hengstler J.G., Bogdanffy M.S., Bolt H.M., & Oesch F. (2003) Challenging dogma: thresholds for genotoxic carcinogens? The case of vinyl acetate. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* **43**, 485-520.
- Hengstler J.G., Ringel M., Biefang K., Hammel S., Milbert U., Gerl M., Klebach M., Diener B., Platt K.L., Bottger T., Steinberg P., & Oesch F. (2000a) Cultures with cryopreserved hepatocytes: applicability for studies of enzyme induction. *Chem.Biol.Interact.* **125**, 51-73.
- Hengstler J.G., Utesch D., Steinberg P., Platt K.L., Diener B., Ringel M., Swales N., Fischer T., Biefang K., Gerl M., Bottger T., & Oesch F. (2000b) Cryopreserved primary hepatocytes as a constantly available in vitro model for the evaluation of human and animal drug metabolism and enzyme induction. *Drug Metab Rev.* **32**, 81-118.
- Hengstler J.G., Van der B.B., Steinberg P., & Oesch F. (1999) Interspecies differences in cancer susceptibility and toxicity. *Drug Metab Rev.* **31**, 917-970.
- Hengstler J.G., Brulport M., Schormann W., Bauer A., Hermes M., Nussler A.K., Fandrich F., Ruhnke M., Ungefroren H., Griffin L., Bockamp E., Oesch F., & von Mach M.A. (2005) Generation of human hepatocytes by stem cell technology: definition of the hepatocyte. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* **1**, 61-74.
- Horslen S.P., McCowan T.C., Goertzen T.C., Warkentin P.I., Cai H.B., Strom S.C., & Fox I.J. (2003) Isolated hepatocyte transplantation in an infant with a severe urea cycle disorder. *Pediatrics* **111**, 1262-1267.
- Horz W. & Altenburger W. (1981) Nucleotide sequence of mouse satellite DNA. *Nucleic Acids Res.* **9**, 683-696.
- Howell J.M. & Mercer J.F. (1994) The pathology and trace element status of the toxic milk mutant mouse. *J.Comp Pathol.* **110**, 37-47.
- Hughes R.D., Mitry R.R., & Dhawan A. (2005) Hepatocyte transplantation for metabolic liver disease: UK experience. *J.R.Soc.Med.* **98**, 341-345.
- Hukkanen J., Lassila A., Paivarinta K., Valanne S., Sarpo S., Hakkola J., Pelkonen O., & Raunio H. (2000) Induction and regulation of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450s in the human A549 lung adenocarcinoma cell line. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* **22**, 360-366.
- Ishikawa F., Drake C.J., Yang S., Fleming P., Minamiguchi H., Visconti R.P., Crosby C.V., Argraves W.S., Harada M., Key L.L., Jr., Livingston A.G., Wingard J.R., & Ogawa M. (2003) Transplanted human cord blood cells give rise to hepatocytes in engrafted mice. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **996**, 174-185.
- Jang Y.Y., Collector M.I., Baylin S.B., Diehl A.M., & Sharkis S.J. (2004) Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nat.Cell Biol.* **6**, 532-539.
- Kakinuma S., Tanaka Y., Chinzei R., Watanabe M., Shimizu-Saito K., Hara Y., Teramoto K., Arii S., Sato C., Takase K., Yasumizu T., & Teraoka H. (2003) Human umbilical cord blood as a source of transplantable hepatic progenitor cells. *Stem Cells* **21**, 217-227.

- Karim N., Allmeling C., Hengstler J.G., Haverich A., & Bader A. (2002) Diazepam metabolism and albumin secretion of porcine hepatocytes in collagen-sandwich after cryopreservation. *Biotechnology Letters* **22**, 1647-1652.
- Kobayashi T., Imamura H., Aoki T., Sugawara Y., Kokudo N., & Makuuchi M. (2006) Morphological Regeneration and Hepatic Functional Mass after Right Hemihepatectomy. *Dig.Surg.* **23**, 44-50.
- Kogler G., Sensken S., Airey J.A., Trapp T., Muschen M., Feldhahn N., Liedtke S., Sorg R.V., Fischer J., Rosenbaum C., Greschat S., Knipper A., Bender J., Degistirici O., Gao J., Caplan A.I., Colletti E.J., Almeida-Porada G., Muller H.W., Zanjani E., & Wernet P. (2004) A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J.Exp.Med.* **200**, 123-135.
- Kollet O., Shivtiel S., Chen Y.Q., Suriawinata J., Thung S.N., Dabeva M.D., Kahn J., Spiegel A., Dar A., Samira S., Goichberg P., Kalinkovich A., Arenzana-Seisdedos F., Nagler A., Hardan I., Revel M., Shafritz D.A., & Lapidot T. (2003) HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34⁺ stem cell recruitment to the liver. *J.Clin.Invest* **112**, 160-169.
- Kusano K.F., Pola R., Murayama T., Curry C., Kawamoto A., Iwakura A., Shintani S., Ii M., Asai J., Tkebuchava T., Thorne T., Takenaka H., Aikawa R., Goukassian D., von Samson P., Hamada H., Yoon Y.S., Silver M., Eaton E., Ma H., Heyd L., Kearney M., Munger W., Porter J.A., Kishore R., & Losordo D.W. (2005) Sonic hedgehog myocardial gene therapy: tissue repair through transient reconstitution of embryonic signaling. *Nat.Med.* **11**, 1197-1204.
- Lagasse E., Connors H., Al Dhalimy M., Reitsma M., Dohse M., Osborne L., Wang X., Finegold M., Weissman I.L., & Grompe M. (2000) Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat.Med.* **6**, 1229-1234.
- Lang D.S., Becker S., Devlin R.B., & Koren H.S. (1996) 2,3,7,8-TCDD induces cytochrome P450 enzyme activity but not proliferation or phenotypical changes in human peripheral blood lymphocytes. *Toxicol.Lett.* **88**, 317-325.
- Langsch A. & Bader A. (2001) Longterm stability of phase I and phase II enzymes of porcine liver cells in flat membrane bioreactors. *Biotechnol.Bioeng.* **76**, 115-125.
- Lee K.D., Kuo T.K., Whang-Peng J., Chung Y.F., Lin C.T., Chou S.H., Chen J.R., Chen Y.P., & Lee O.K. (2004) In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology* **40**, 1275-1284.
- Lepidi H., Fenollar F., Gerolami R., Mege J.L., Bonzi M.F., Chappuis M., Sahel J., & Raoult D. (2003) Whipple's disease: immunospecific and quantitative immunohistochemical study of intestinal biopsy specimens. *Hum.Pathol* **34**, 589-596.
- Li A.P., Gorycki P.D., Hengstler J.G., Kedderis G.L., Koebe H.G., Rahmani R., de Sousas G., Silva J.M., & Skett P. (1999) Present status of the application of cryopreserved hepatocytes in the evaluation of xenobiotics: consensus of an international expert panel. *Chem.Biol.Interact.* **121**, 117-123.
- Liu F., Song Y., & Liu D. (1999) Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther.* **6**, 1258-1266.
- Michalopoulos G.K. & DeFrances M.C. (1997) Liver regeneration. *Science* **276**, 60-66.

- Miksys S., Hoffmann E., & Tyndale R.F. (2000) Regional and cellular induction of nicotine-metabolizing CYP2B1 in rat brain by chronic nicotine treatment. *Biochem.Pharmacol.* **59**, 1501-1511.
- Mitry R.R., Dhawan A., Hughes R.D., Bansal S., Lehec S., Terry C., Heaton N.D., Karani J.B., Mieli-Vergani G., & Rela M. (2004) One liver, three recipients: segment IV from split-liver procedures as a source of hepatocytes for cell transplantation. *Transplantation* **77**, 1614-1616.
- Munakata Y., Saito T., Watanabe T., Fujii H., & Morimoto C. (2004) Rapid inhibitory effect of tacrolimus on T cell migration by suppressing CD29-related functions. *Clin.Exp.Rheumatol.* **22**, 197-204.
- Muraca M., Gerunda G., Neri D., Vilei M.T., Granato A., Feltracco P., Meroni M., Giron G., & Burlina A.B. (2002) Hepatocyte transplantation as a treatment for glycogen storage disease type 1a. *Lancet* **359**, 317-318.
- Murase N., Starzl T.E., Ye Q., Tsamandas A., Thomson A.W., Rao A.S., & Demetris A.J. (1996) Multilineage hematopoietic reconstitution of supralethally irradiated rats by syngeneic whole organ transplantation. With oarticular reference to the liver. *Transplantation* **61**, 1-4.
- Newsome P.N., Johannessen I., Boyle S., Dalakas E., McAulay K.A., Samuel K., Rae F., Forrester L., Turner M.L., Hayes P.C., Harrison D.J., Bickmore W.A., & Plevris J.N. (2003) Human cord blood-derived cells can differentiate into hepatocytes in the mouse liver with no evidence of cellular fusion. *Gastroenterology* **124**, 1891-1900.
- Nonome K., Li X.K., Takahara T., Kitazawa Y., Funeshima N., Yata Y., Xue F., Kanayama M., Shinno E., Kuwae C., Saito S., Watanabe A., & Sugiyama T. (2005) Human umbilical cord blood-derived cells differentiate into hepatocyte-like cells in the Fas-mediated liver injury model. *Am J Physiol Gastrointest.Liver Physiol* **289**, G1091-G1099.
- Nussler A., Konig S., Ott M., Sokal E., Christ B., Thasler W., Brulport M., Gabelein G., Schormann W., Schulze M., Ellis E., Kraemer M., Nocken F., Fleig W., Manns M., Strom S.C., & Hengstler J.G. (2006) Present status and perspectives of cell-based therapies for liver diseases. *J Hepatol.*
- O'Brien C.D., Lim P., Sun J., & Albelda S.M. (2003) PECAM-1-dependent neutrophil transmigration is independent of monolayer PECAM-1 signaling or localization. *Blood* **101**, 2816-2825.
- Ott M., Schmidt H.H., Cichon G., & Manns M.P. (2000) Emerging therapies in hepatology: liver-directed gene transfer and hepatocyte transplantation. *Cells Tissues.Organs* **167**, 81-87.
- Pelz O., Wu M., Nikolova T., Kamprad M., Ackermann M., Egger D., Emmrich F., Wobus A.M., & Cross M. (2005) Duplex polymerase chain reaction quantification of human cells in a murine background. *Stem Cells* **23**, 828-833.
- Pernick N. Pathology Outlines, CD-Markers.
<http://www.pathologyoutlines.com/cdmarkers.html> . 2006.
Ref Type: Electronic Citation
- Petersen B.E., Bowen W.C., Patrene K.D., Mars W.M., Sullivan A.K., Murase N., Boggs S.S., Greenberger J.S., & Goff J.P. (1999) Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* **284**, 1168-1170.

- Reder-Hilz B., Ullrich M., Ringel M., Hewitt N., Utesch D., Oesch F., & Hengstler J.G. (2004) Metabolism of propafenone and verapamil by cryopreserved human, rat, mouse and dog hepatocytes: comparison with metabolism in vivo. *Naunyn Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.* **369**, 408-417.
- Ringel M., Oesch F., Gerl M., Klebach M., Quint M., Bader A., Bottger T., & Hengstler J.G. (2002) Permissive and suppressive effects of dexamethasone on enzyme induction in hepatocyte co-cultures. *Xenobiotica* **32**, 653-666.
- Ringel M., von Mach M.A., Santos R., Feilen P.J., Brulport M., Hermes M., Bauer A.W., Schormann W., Tanner B., Schon M.R., Oesch F., & Hengstler J.G. (2005) Hepatocytes cultured in alginate microspheres: an optimized technique to study enzyme induction. *Toxicology* **206**, 153-167.
- Rozen S. & Skaletsky H. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol.Biol.* **132**, 365-386.
- Ruhnke M., Nussler A.K., Ungefroren H., Hengstler J.G., Kremer B., Hoeckh W., Gottwald T., Heeckt P., & Fandrich F. (2005a) Human monocyte-derived neohepatocytes: a promising alternative to primary human hepatocytes for autologous cell therapy. *Transplantation* **79**, 1097-1103.
- Ruhnke M., Ungefroren H., Nussler A., Martin F., Brulport M., Schormann W., Hengstler J.G., Klapper W., Ulrichs K., Hutchinson J.A., Soria B., Parwaresch R.M., Heeckt P., Kremer B., & Fandrich F. (2005b) Differentiation of in vitro-modified human peripheral blood monocytes into hepatocyte-like and pancreatic islet-like cells. *Gastroenterology* **128**, 1774-1786.
- Ruhnke M., Ungefroren H., Nussler A., Martin F., Brulport M., Schormann W., Hengstler J.G., Klapper W., Ulrichs K., Hutchinson J.A., Soria B., Parwaresch R.M., Heeckt P., Kremer B., & Fandrich F. (2005c) Differentiation of in vitro-modified human peripheral blood monocytes into hepatocyte-like and pancreatic islet-like cells. *Gastroenterology* **128**, 1774-1786.
- Salmon P., Oberholzer J., Occhiodoro T., Morel P., Lou J., & Trono D. (2000) Reversible immortalization of human primary cells by lentivector-mediated transfer of specific genes. *Mol.Ther.* **2**, 404-414.
- Schwartz R.E., Reyes M., Koodie L., Jiang Y., Blackstad M., Lund T., Lenvik T., Johnson S., Hu W.S., & Verfaillie C.M. (2002) Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J.Clin.Invest* **109**, 1291-1302.
- Science Gateway. Science Gateway - Cluster of Differentiation (PROW).
<http://www.sciencegateway.org/resources/prow/index.html> . 2006.
Ref Type: Electronic Citation
- Sebestyen M.G., Budker V.G., Budker T., Subbotin V.M., Zhang G., Monahan S.D., Lewis D.L., Wong S.C., Hagstrom J.E., & Wolff J.A. (2006) Mechanism of plasmid delivery by hydrodynamic tail vein injection. I. Hepatocyte uptake of various molecules. *J Gene Med.*
- Sharma A.D., Cantz T., Richter R., Eckert K., Henschler R., Wilkens L., Jochheim-Richter A., Arseniev L., & Ott M. (2005) Human cord blood stem cells generate human cytokeratin 18-negative hepatocyte-like cells in injured mouse liver. *American Journal of Pathology* **167**, 555-564.

- Shimada T., Mimura M., Inoue K., Nakamura S.i., Oda H., Ohmori S., & Yamazaki H. (1997) Cytochrome P450-dependent drug oxidation activities in liver microsomes of various animal species including rats, guinea pigs, dogs, monkeys, and humans. *Archives of Toxicology* **71**, 401-408.
- Sokal E.M., Smets F., Bourgois A., Van Maldergem L., Buts J.P., Reding R., Bernard O.J., Evrard V., Latinne D., Vincent M.F., Moser A., & Soriano H.E. (2003) Hepatocyte transplantation in a 4-year-old girl with peroxisomal biogenesis disease: technique, safety, and metabolic follow-up. *Transplantation* **76**, 735-738.
- Stangl M.J., Beuers U., Schauer R., Lang T., Gerbes A., Briegel J., Da Silva L., Schildberg F.W., & Rau H.G. (2000) Die allogene Lebertransplantation – eine Form der Genterapie bei metabolischen Erkrankungen. *Der Chirurg* **71**, 808-819.
- Steinberg P., Fischer T., Kiulies S., Biefang K., Platt K.L., Oesch F., Bottger T., Bulitta C., Kempf P., & Hengstler J. (1999) Drug metabolizing capacity of cryopreserved human, rat, and mouse liver parenchymal cells in suspension. *Drug Metab Dispos.* **27**, 1415-1422.
- Stephenne X., Najimi M., Smets F., Reding R., de Ville d.G., & Sokal E.M. (2005) Cryopreserved liver cell transplantation controls ornithine transcarbamylase deficient patient while awaiting liver transplantation. *Am.J.Transplant.* **5**, 2058-2061.
- Streyer L. (1995) Biochemie, Vierte Ausgabe edn. Spektrum Akademischer Verlag.
- Strom S.C., Fisher R.A., Rubinstein W.S., Barranger J.A., Towbin R.B., Charron M., Miele L., Pisarov L.A., Dorko K., Thompson M.T., & Reyes J. (1997a) Transplantation of human hepatocytes. *Transplant.Proc.* **29**, 2103-2106.
- Strom S.C., Fisher R.A., Thompson M.T., Sanyal A.J., Cole P.E., Ham J.M., & Posner M.P. (1997b) Hepatocyte transplantation as a bridge to orthotopic liver transplantation in terminal liver failure. *Transplantation* **63**, 559-569.
- Terada N., Hamazaki T., Oka M., Hoki M., Mastalerz D.M., Nakano Y., Meyer E.M., Morel L., Petersen B.E., & Scott E.W. (2002) Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* **416**, 542-545.
- Theise N.D. (2003) Liver stem cells: the fall and rise of tissue biology. *Hepatology* **38**, 804-806.
- Theise N.D., Badve S., Saxena R., Henegariu O., Sell S., Crawford J.M., & Krause D.S. (2000) Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* **31**, 235-240.
- Turrini P., Monego G., Gonzalez J., Cicuzza S., Bonanno G., Zelano G., Rosenthal N., Pao-nessa G., Laufer R., & Padron J. (2005) Human hepatocytes in mice receiving pre-immune injection with human cord blood cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **326**, 66-73.
- Vassilopoulos G., Wang P.R., & Russell D.W. (2003) Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* **422**, 901-904.
- von Mach M.A., Hengstler J.G., Brulport M., Eberhardt M., Schormann W., Hermes M., Prawitt D., Zabel B., Grosche J., Reichenbach A., Muller B., Weilemann L.S., & Zulewski H. (2004) In vitro cultured islet-derived progenitor cells of human origin express human albumin in severe combined immunodeficiency mouse liver in vivo. *Stem Cells* **22**, 1134-1141.

Wahn U., Seger R., Wahn V., & Holländer G. Immundefekt Zentrum der Charité, Die CD-Nomenklatur. <http://www.immundefekt.de/cd.shtml> . 2005.

Ref Type: Electronic Citation

Wang X., Ge S., McNamara G., Hao Q.L., Crooks G.M., & Nolta J.A. (2003a) Albumin-expressing hepatocyte-like cells develop in the livers of immune-deficient mice that received transplants of highly purified human hematopoietic stem cells. *Blood* **101**, 4201-4208.

Wang X., Willenbring H., Akkari Y., Torimaru Y., Foster M., Al Dhalimy M., Lagasse E., Finegold M., Olson S., & Grompe M. (2003b) Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* **422**, 897-901.

Warburton P.E., Greig G.M., Haaf T., & Willard H.F. (1991) PCR amplification of chromosome-specific alpha satellite DNA: definition of centromeric STS markers and polymorphic analysis. *Genomics* **11**, 324-333.

Willenbring H., Bailey A.S., Foster M., Akkari Y., Dorrell C., Olson S., Finegold M., Fleming W.H., & Grompe M. (2004) Myelomonocytic cells are sufficient for therapeutic cell fusion in liver. *Nat.Med.* **10**, 744-748.

Wortelboer H.M., de Kruif C.A., van Iersel A.A., Falke H.E., Noordhoek J., & Blaauboer B.J. (1991) Comparison of cytochrome P450 isoenzyme profiles in rat liver and hepatocyte cultures. The effects of model inducers on apoproteins and biotransformation activities. *Biochem.Pharmacol.* **42**, 381-390.

WSU C.o.V.M. Washington State Univeristy, College of Veterinary Medicine, Monoclonal Antibody Center, Taxonomic Key Program. <http://www.vetmed.wsu.edu/tkp/Search.aspx> . 2006.

Ref Type: Electronic Citation

Yakubov L.A., Deeva E.A., Zarytova V.F., Ivanova E.M., Ryte A.S., Yurchenko L.V., & Vlassov V.V. (1989) Mechanism of oligonucleotide uptake by cells: involvement of specific receptors? *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **86**, 6454-6458.

Ying Q.L., Nichols J., Evans E.P., & Smith A.G. (2002) Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* **416**, 545-548.

Zeng F., Chen M., Katsumata M., Huang W., Gong Z., Hu W., Qian H., Xiao Y., Ren Z., & Huang S. (2005) Identification and characterization of engrafted human cells in human/goat xenogeneic transplantation chimerism. *DNA Cell Biol.* **24**, 403-409.

Zhang G., Budker V., & Wolff J.A. (1999) High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA. *Hum.Gene Ther.* **10**, 1735-1737.

Zhang Q.Y., Dunbar D., & Kaminsky L.S. (2003) Characterization of mouse small intestinal cytochrome P450 expression. *Drug Metab Dispos.* **31**, 1346-1351.

Zhao Y., Glesne D., & Huberman E. (2003) A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100**, 2426-2431.

Zulewski H., Abraham E.J., Gerlach M.J., Daniel P.B., Moritz W., Muller B., Vallejo M., Thomas M.K., & Habener J.F. (2001) Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes* **50**, 521-533.

8 Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Phenylalanin- / Tyrosinabbau.....	Seite 10
Abbildung 2	Experimentelle Ansätze zur Identifikation von Fusion und Transdifferenzierung...	Seite 14
Abbildung 3	Stammzellen in Kultur.....	Seite 32
Abbildung 4	Strukturformel von CM-DiI.....	Seite 37
Abbildung 5	Transplantation von Stammzellen in das Parenchym von NOD/SCID-Mäusen.....	Seite 39
Abbildung 6	Nukleotid-Sequenz der Mouse-Major-Satellite-DNA.....	Seite 46
Abbildung 7	Absorptionsspektrum von Kalbsthymus-DNA in TE-Puffer gelöst.....	Seite 51
Abbildung 8	Intron 3-4 der genomischen Sequenz humanen Albumins (Ensembl).....	Seite 53
Abbildung 9	EROD-Assay als metabolischer Parameter für CYP1A-Isoenzyme.....	Seite 55
Abbildung 10	Induktionsschema für Neohepatozyten.....	Seite 56
Abbildung 11	Resorufinkalibrierung und lineare Regression der Kalibrierung.....	Seite 56
Abbildung 12	Qdot655- und CM-DiI-markierte Stammzellen, Kernfärbung mit DAPI.....	Seite 57
Abbildung 13	CM-DiI-positive Einzelzele und Areal im transplantierten Gewebe.....	Seite 58
Abbildung 14	Verschiedene Zeitpunkte der Explantation nach Transplantation Qdot655-markierter Stammzellen ins Leberparenchym.....	Seite 59
Abbildung 15	Leberkontrollen in der Immunhistochemie zur Detektion humanen Albumins auf Leberschnitten von Mensch und Maus.....	Seite 61
Abbildung 16	Immunhistochemische Kontrolle der Stammzellen vor Transplantation.....	Seite 62
Abbildung 17	Immunhistochemische Detektion humanen Albumins nach Transplantation humaner Primärhepatozyten in das Leberparenchym von NOD/SCID-Mäusen.....	Seite 62
Abbildung 18	Immunhistochemische Detektion humanen Albumins nach Transplantation adherent proliferierender Nabelschnurblutzellen (Typ I und Typ II) in das Leberparenchym von NOD/SCID-Mäusen.....	Seite 64
Abbildung 19	Immunhistochemische Detektion humanen Albumins nach Transplantation hepatopankreatischer Vorläuferzellen (Typ I und Typ II) in das Leberparenchym von NOD/SCID-Mäusen.....	Seite 66
Abbildung 20	Immunhistochemische Detektion humanen Albumins nach Transplantation <i>in vitro</i> ausdifferenzierter Neohepatozyten (Typ I und Typ II) in das Leberparenchym von NOD/SCID-Mäusen.....	Seite 67
Abbildung 21	Immunhistochemische Detektion humanen Albumins nach Transplantation <i>in vitro</i> ausdifferenzierter Neohepatozyten in das Leberparenchym von uPA/RAG-Mäuse.....	Seite 68
Abbildung 22	Kombinierte immunhistochemische Detektion humanen und murinen Albumins...	Seite 69
Abbildung 23	Leberkontrollen in der Immunhistochemie zur Detektion von HepPar1 auf Leberschnitten von Mensch und Maus.....	Seite 70

Abbildung 24	Aufnahmen Qdot655-positiver Bereiche vor der HepPar1-Immunhistochemie, der gleichen Stelle nach der HepPar1-Immunhistochemie und Überlagerung beider Aufnahmen.....	Seite 71
Abbildung 25	PAS-Färbung nach Transplantation humaner Stammzellen.....	Seite 72
Abbildung 26	Berliner-Blau-Reaktion nach Transplantation humaner Stammzellen.....	Seite 73
Abbildung 27	Positiv- und Negativkontrollen in der <i>in situ</i> Hybridisierung.....	Seite 74
Abbildung 28	<i>Alu</i> -positive Kerne und Mouse-major-satellite-positive Kerne in der <i>in situ</i> Hybridisierung nach Transplantation humaner Primärhepatozyten.....	Seite 75
Abbildung 29	CM-DiI-positive Bereiche und <i>Alu</i> -positive Kerne in Relation.....	Seite 77
Abbildung 30	Typ I human Albumin-positive Zelle, die einen <i>Alu</i> -negativen, aber Mouse-major-satellite-positiven Kern besitzt.....	Seite 78
Abbildung 31	In einem CM-DiI-positiven Bereich gefundene Typ II human Albumin-positive Zellen, die <i>Alu</i> -positive Kerne besitzen.....	Seite 79
Abbildung 32	Agarose/Ethidiumbromid-Gel nach PCR der seriellen Verdünnungsreihe.....	Seite 81
Abbildung 33	EROD-Assay zur Bestimmung der CYP1A-Aktivität bei Neohepatozyten.....	Seite 83
Abbildung 34	Morphologie extrahepatischer Stammzellen nach Transplantation in die Leber immundefizienter Mäuse. Vergleich publizierter Bilder.....	Seite 89
Abbildung 35	Die Expression von CD10 der in der vorliegenden Arbeit transplantierten Nabelschnurblutzellen mit den von Kogler et al. transplantierten Zellen.....	Seite 94
Abbildung 36	Die Expression von CD13 der in der vorliegenden Arbeit transplantierten Nabelschnurblutzellen mit den von Kogler et al. transplantierten Zellen.....	Seite 94
Abbildung 37	Die Expression von CD29 der in der vorliegenden Arbeit transplantierten Nabelschnurblutzellen mit den von Kogler et al. transplantierten Zellen.....	Seite 95
Abbildung 38	Die Expression von CD34 der in der vorliegenden Arbeit transplantierten Nabelschnurblutzellen mit den von Kogler et al. transplantierten Zellen.....	Seite 96
Abbildung 39	Die Expression von CD44 der in der vorliegenden Arbeit transplantierten Nabelschnurblutzellen mit den von Kogler et al. transplantierten Zellen.....	Seite 96
Abbildung 40	Die Expression von CD49e der in der vorliegenden Arbeit transplantierten Nabelschnurblutzellen mit den von Kogler et al. transplantierten Zellen.....	Seite 96
Abbildung 41	Die Expression von CD90 der in der vorliegenden Arbeit transplantierten Nabelschnurblutzellen mit den von Kogler et al. transplantierten Zellen.....	Seite 97
Abbildung 42	Die Expression von CD105 der in der vorliegenden Arbeit transplantierten Nabelschnurblutzellen mit den von Kogler et al. transplantierten Zellen.....	Seite 97
Abbildung 43	Die Expression von CD31 und CD146 bei den in der vorliegenden Arbeit transplantierten Nabelschnurblutzellen.....	Seite 98

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Kriterien für Hepatozyten und Hepatozyten-ähnliche Zellen.....	Seite 7
Tabelle 2	Biotinylierungsanleitung für den HepPar-Primärantikörper.....	Seite 49
Tabelle 3	PCR-Bedingungen, Primer und Endkonzentrationen der Reagenzien.....	Seite 53
Tabelle 4	Anzahl Qdot-positiver Bereiche in transplantiertem Gewebe in Kinetik.....	Seite 58
Tabelle 5	Übersicht über scheintransplantierte Mäuse.....	Seite 61
Tabelle 6	Übersicht über transplantierte adhärent proliferierende Nabelschnurblutzellen in das Leberparenchym von NOD/SCID-Mäusen.....	Seite 63
Tabelle 7	Übersicht über transplantierte hepatopankreatische Vorläuferzellen in das Leber- parenchym von NOD/SCID-Mäusen.....	Seite 65
Tabelle 8	Übersicht über transplantierte Neohepatozyten in das Leberparenchym von NOD/SCID-Mäusen.....	Seite 67
Tabelle 9	Übersicht über transplantierte adhärent proliferierende Nabelschnurblutzellen in das Leberparenchym von uPA/RAG-Mäusen.....	Seite 68
Tabelle 10	<i>Alu</i> -positive Kerne in der Transplantationskinetik mit Qdot655-positiven Berei- chen im Vergleich.....	Seite 76
Tabelle 11	Anteil humaner DNA in Mausleber, bestimmt mittels Duplex-PCR.....	Seite 80
Tabelle 12	Serielle Verdünnungsreihe genomischer Mensch-DNA in Maus-DNA.....	Seite 81
Tabelle 13	Vergleich publizierter Ergebnisse von verschiedenen Stammzellen in Mäuse.....	Seite 86
Tabelle 14	Vergleich publizierter Ergebnisse von verschiedenen Stammzellen in weitere Tiermodelle.....	Seite 87

Danksagung

Danken möchte ich Prof. Dr. Hengstler für die Überlassung des interessanten Themas, steter ideenreicher und zu jeder Zeit vorhandenen Diskussionsbereitschaft, sowie die angenehme Arbeitsatmosphäre, zu der selbstredend auch Wiebke Schormann, Matthias Hermes, Alexander Bauer, Elke Navratil, Adelgunde Gräfe, Christian Sauer, Markus Schug, Jakob Hammersten und Peter Kosubek beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Carolin für ihre stete Unterstützung, Aufheiterung, sowie alles anderem während der vergangenen zweieinhalb Jahre.

Meiner Familie möchte ich für die Unterstützung in allen Lebenslagen und zahlreiche aufmunternde Gespräche danken.

Jens Grosche gilt mein Dank für die Einführung in die konfokale Mikroskopie, sowie für hilfreiche Ideen zu meiner Arbeit.

Wolfgang Härtig möchte ich für viele Ideen und Tipps zur Immunhistochemie danken.

Mein spezieller Dank gilt noch all denen, die meine Arbeit geduldig korrigiert haben.

Herrn Prof. Dr. Eisenbrand möchte ich ganz herzlich für die externe Betreuung der vorliegenden Arbeit danken, durch die meine Promotion ermöglicht wurde.

Lebenslauf

SCHULAUSBILDUNG

1982 – 1986 Grundschule Mariahof, Trier
1986 – 1995 Friedrich-Wilhelm-Gymnasium, Trier

AKADEMISCHE AUSBILDUNG

1996 – 2002 Studium, Universität Kaiserslautern
Fachrichtung Lebensmittelchemie

10.1999 Staatliche Vorprüfung im Fach Lebensmittelchemie
03.2002 Abschluss als Diplom Lebensmittelchemiker

01.2003 Beginn der Promotion
Institut für Toxikologie, Universität Mainz
In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hengstler

06.2003 Fortführung der Promotion nach Umzug
Zentrum für Toxikologie, Universität Leipzig
In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hengstler

SONSTIGE TÄTIGKEITEN

1995 - 1996 Zivildienst im Club Aktiv Trier e.V.
2000 25.09. – 20.10.:
Praktikum in der Staatlichen Lehr- und Versuchsanstalt Trier,
Fachbereich für Oenologie und Kellerwirtschaft

2001 01.12.01 – 31.01.02
Universität Kaiserslautern,
Fachbereich Chemie/Abteilung Lebensmittelchemie,
Betreuung eines Praktikums

2002 22.04.02 – 07.06.02
Umweltlabor Westpfalz, Kaiserslautern,
Labortätigkeit

2003 - 2006 Mitbetreuung bei drei medizinischen Promotionen

AUSZEICHNUNGEN

2000 Procter & Gamble – Preis für das beste Vordiplom
2003 Prof. Dr. Drs. h.c. Adolf Steinhöfer – Stiftung mit Sitz in Kaiserslautern:
Steinhöfer-Preis 2002 für ein herausragendes Diplom in Lebensmittelchemie

PUBLIKATIONSLISTE

Eger K., Hermes M., Uhlemann K., Rodewald S., Ortwein J., Brulport M., Bauer A.W., Schormann W., Lupatsch F., Schiffer I.B., Heimerdinger C.K., Gebhard S., Spangenberg C., Prawitt D., Trost T., Zabel B., Sauer C., Tanner B., Kolbl H., Krügel U., Franke H., Illes P.,

Madaj-Sterba P., Bockamp E.O., Beckers T., & Hengstler J.G. (2004) 4-Epidoxycycline: an alternative to doxycycline to control gene expression in conditional mouse models. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **323**, 979-986.

Hengstler J.G., Brulport M., Schormann W., Bauer A., Hermes M., Nussler A.K., Fandrich F., Ruhnke M., Ungefroren H., Griffin L., Bockamp E., Oesch F., & von Mach M.A. (2005) Generation of human hepatocytes by stem cell technology: definition of the hepatocyte. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* **1**, 61-74.

Ringel M., von Mach M.A., Santos R., Feilen P.J., Brulport M., Hermes M., Bauer A.W., Schormann W., Tanner B., Schon M.R., Oesch F., & Hengstler J.G. (2005) Hepatocytes cultured in alginate microspheres: an optimized technique to study enzyme induction. *Toxicology* **206**, 153-167.

Ruhnke M., Ungefroren H., Nussler A., Martin F., Brulport M., Schormann W., Hengstler J.G., Klapper W., Ulrichs K., Hutchinson J.A., Soria B., Parwaresch R.M., Heeckt P., Kremer B., & Fandrich F. (2005) Differentiation of in vitro-modified human peripheral blood monocytes into hepatocyte-like and pancreatic islet-like cells. *Gastroenterology* **128**, 1774-1786.

Tanner B., Schiffer I.B., Heimerdinger C., Glawatz C., Schmidt M., Brulport M., Hermes M., Pasuello V., Boehm D.U., Neubert S., Naumann G., K÷lhl H., & Hengstler J.G. (2004) Perspektiven HER-2 blockierender Therapiestrategien im Mausmodell: Rasche Tumorremission in Abhängigkeit vom Tumorstadium, aber keine dauerhafte Heilung. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* 821-830.

von Mach M.A., Hengstler J.G., Brulport M., Eberhardt M., Schormann W., Hermes M., Prawitt D., Zabel B., Grosche J., Reichenbach A., Muller B., Weilemann L.S., & Zulewski H. (2004) In vitro cultured islet-derived progenitor cells of human origin express human albumin in severe combined immunodeficiency mouse liver in vivo. *Stem Cells* **22**, 1134-1141.

Hengstler J.G., Heimerdinger C., Schiffer I.B., Brulport M. (2003) Toxikologie und Kanzerogenität: Gibt es einen Schwellenmechanismus? *Forum DKG* **6**, 26-30.

Michael Eberhardt , Patrick Salmon , Marc-Alexander von Mach , Jan Georg Hengstler , Marc Brulport , Philippe Linscheid , Dalma Seboek , José Oberholzer , Andrea Barbero , Ivan Martin , Beat Müller ,Didier Trono, Henryk Zulewski. (2006) Multipotential nestin and Isl-1 positive mesenchymal stem cells isolated from human pancreatic islets. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* xxx (2006) xxx-xxx

Andreas Nussler , Sarah König , Michael Ott , Etienne Sokal , Bruno Christ ,Wolfgang Thasler , Marc Bulport , Gerion Gabelein , Wiebke Schormann , Maren Schulze , Ewa Ellis , Matthias Kraemer , Frank Nocken , Wolfgang Fleig , Michael Manns , Steven C. Strom , Jan G. Hengstler. (2006) Present status and perspectives of cell-based therapies for liver diseases.